

Integración de mecanismos de control redox y de señalización de nutrientes en la longevidad cronológica en levaduras vínicas



Cecilia Picazo Campos

Integración de mecanismos de control redox y de señalización de nutrientes en la longevidad cronológica de levaduras vínicas



Trabajo realizado por Cecilia Picazo Campos en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, CSIC, para optar al grado de Doctora por la Universitat de València

Valencia, mayo de 2017

AGUSTÍN ARANDA FERNÁNDEZ, doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, IATA) y EMILIA MATAALLANA REDONDO, doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitar de València

CERTIFICAN que la presente Tesis Doctoral titulada “Integración de Mecanismos de control redox y de señalización de nutrientes en la longevidad cronológica de levaduras vínicas” ha sido realizada por la licenciada en Biología Srta Cecilia Picazo Campos, bajo su dirección en su laboratorio del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos del CSIC

Valencia, mayo de 2017

Fdo: Agustín Aranda Fernández

Fdo: Emilia Matallana Redondo

Resulta sorprendente cómo pasa el tiempo. Son muchas muchas personas las que me han aguantado a lo largo de estos años y digo yo! Mejor agradecerlo en palabras que invitando a cervezas! (me arruinaría).

Ante todo, muchísimas gracias a mis directores Agustín y Emilia. Gracias por darme la oportunidad de realizar un trabajo tan bonito y tan apasionante. Gracias por transmitirme esa pasión por la ciencia, por enseñarme tanto. A Agustín, por su gran capacidad como investigador. Gracias por estar ahí, por ayudarme tanto en la parte experimental como escuchando y aportando muy buenas ideas, gracias por tu paciencia.

Ya han pasado más de cinco años de que empecé mi aventura investigadora en este laboratorio. Y es que a veces, el destino conecta a las personas. En mi mar de desesperación por encontrar un laboratorio donde poder hacer el trabajo fin de máster la encontré. Sólo nos dio una clase pero fue suficiente para encandilarme. Y es que ella es así! Muchísimas gracias Emilia por todo, por acogerme tan bien en el laboratorio, por tener siempre tiempo para todos, por preocuparte por cosas del laboratorio y por cosas que no lo son. Por ser un apoyo fundamental, una amiga, un ejemplo a seguir.

A mi laboratorio, el 302 y ahora el 4.1, a todos los compañeros y amigos que han pasado por ahí. Porque todos, en mayor o menor medida han dejado huella en mi. A Rocio, Paco, Iván, Ana, Inma y Sandra que, aunque durante poco tiempo, compartimos muy buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. A Helena, por estar ahí sobre todo en mis inicios, por nuestro carácter muchas veces incontrolable. Gracias por todo. A Esther, por esa conexión que tenemos, por las risas, por los consejos, por preocuparte y ayudarme en todo, por esas escapadas a la planta piloto. Muchas gracias por ser una gran compañera y amiga, sin tí no hubiera sido lo mismo. A la nueva plantilla de maripilis. Como ya os dije un día, gracias por haberle dado vida al laboratorio. Gracias a Max (eres una maripili más) porque a pesar de estar calladito o intentarlo, te enteras de todo y estas pendiente de todas. Muchas gracias por tu apoyo tus críticas musicales y tu ayuda con el GSH (jeje). A Bea por su gran capacidad de trabajo, su compañerismo y las risas flojas que le salen cuando está muy cansada. A Nubia por ser mi psicóloga de campana. Porque el poco tiempo que te conozco parece como si fuesen años. Gracias por hacerme reflexionar y ver las cosas importantes de la vida. A Maria que iba a estar de paso pero se quedó para siempre. Gracias por tu forma de ser, por esa alegría que desprendes, por ese odio gracioso a todo y por tu capacidad de superación. A Marta, SantaMarta, porque siempre estás ahí, porque eres una de las personas más comprometidas con su trabajo que conozco. Por ser tan profesional, por todo lo que nos ayudas. Por esas risas dentro y fuera del laboratorio. Muchas gracias de verdad, por aguantarme a mí y a mi música aunque en el fondo sé que me quereis y que os encanta Izal.

Al departamento de bioquímica y biología molecular por la ayuda recibida durante estos años tanto en temas de docencia, en los seminarios realizados y en los trámites de doctorado.

A la gente del IATA, muchísimas gracias por todos estos años compartidos de trabajo y risas. Gracias a los jefazos de la tercera planta. Gracias por dejar que me acoplase a todos los eventos como hija adoptiva. Gracias a José Manuel, Sergi, Mayte, Eladio, Paqui, Jose Antonio, Marga, Andrew, Paloma, Rosa, Carmela y en especial a mi madre adoptiva, Amparo.

A mis vecinos de laboratorio, Carmen, Oscar y Jaime. Muchas gracias chicos por estos años compartiendo campana, por las risas, por las conversaciones. Gracias Oscar por estar ahí, por el apoyo, por tus bromas, por todo.

A mi secta querida. No me imagino unos compañeros y amigos mejores que vosotros. Mil gracias por todo lo vivido, por las risas, los enfados, los llantos, las conversaciones, las fiestas. A Fani, muchísimas gracias por esos viajes juntas, por las risas dentro y fuera del laboratorio, por tener una respuesta para todo y ganarte el apodo de Fanipedia más que merecido. A Ying por tu simpatía y tu bondad. A N-Ric por tu serenidad, por el gusto exquisito a la cerveza, por las risas jugando a juegos de mesa. A Sara (Sandri para los amiguís) por esa bondad que te caracteriza, por decir las cosas tal y como las piensas, por estar siempre ahí y por preocuparte de todo y de todos. A Lucía por tu carácter, por los piques, por la cuqui-llamada, por el superviaje a Haro, por las conversaciones en el tranvía. A las primas, porque sois únicas, porque os quiero y os odio a la vez. A Anto, por estar siempre ahí, por aguantar mis paranoias una y otra vez, por tu amistad, tu templanza, tu manera de escuchar y de opinar, por las clases de spinning, por las no clases de aerogap sustituidas por cerveza. A Adri, por ser la reina y la segunda macha alfa (la primera soy yo ☺), por tus consejos sinceros, por nuestro carácter parecido, gracias de todo corazón por toda la ayuda y apoyo durante estos años. A Javi, por ser el fundador de la secta, por estar siempre ahí, por las risas, por los viajes en coche al trabajo. A Jirito, muchísimas gracias por tu apoyo, por tus piques, por las risas, los bailes y las confesiones. A Aurora, gracias por los inicios, por tu forma de ser, por ser tan directa, por tus gritos de JEFEEE y de ERES EL PUTO AMOO, porque sin ti no sería lo mismo. Al italianni Walter, gracias porque a pesar de que eres “nuevo” en la secta has sabido integrarte y llegar a nuestros corazones. A Miguel, por las conversaciones en Haro, por las risas y las salidas a fumar. A las nuevas incorporaciones, la secta va creciendo!! , a Maria, a Roberto y a Laura.

Gracias a Mikael Molin y Thomas Nyström de la Universidad de Göteborg por interesarse en nuestra investigación, por ponerlo todo tan fácil. Gracias por estos 4 intensos meses en la universidad en la que he aprendido muchísimas cosas. Gracias en especial a Ken Peeters porque sin él no hubiese sido lo mismo. Gracias por tu forma de ser y por tu ayuda.

Gracias a mi familia de Göteborg porque no he podido tener más suerte. Gracias a todos, a los españolitos: Elisa, Ana, Jose, Pablo, Mario y en especial a Elena Garre. Gracias Elena por ser tan buena conmigo, por acogerme en tu grupo, por ayudarme tanto en lo experimental como en los problemas de la vida. Eres una grandísima persona. A mis chicos de Vega, porque desde el primer día me hicisteis sentir en casa, por las fiestas en la residencia, por las pelis, los viajes, las risas, los bailes, por todo. Gracias Nachiket, Musard, Jib, Steven, Luca y en especial a mi trío VEGA. Gracias Javi por haber hecho de los 4 meses en Göteborg una experiencia inolvidable. Gracias Lore! Porque aún no había dejado la maleta en la habitación y ya éramos amigas! Por tu amabilidad, por nuestra convivencia 24 horas, las charlas, las cerves, las duchas, los llantos, los viajes, las confesiones... En fin... Muchas gracias por todo.

Al laboratorio de Toño Bárcena de la Universidad de Córdoba. Gracias porque desde el primer momento lo hiciste todo muy fácil, por esa gran acogida, por hacerme sentir agustísimo, por las risas, las comilonas. Gracias a Emilia, Alicia, Pepe, Tina, Raúl, M^a Carmen, Jose y en general

a todos los que me ayudaron e hicieron de mis estancias en la universidad de Córdoba algo maravilloso. En especial a M^aJosé por ayudarme a utilizar los programas de análisis y por su comprensión. Seguro que te va a ir genial! A Brian, por su apoyo y ayuda, por sus explicaciones, por todo. Y a Toño, muchísimas gracias por tu interés por la investigación, por las estancias en Córdoba, por tu apoyo, por escucharme, por explicarme las cosas, por la estancia en Nueva York. Gracias porque en tu laboratorio me siento como en casa.

A mis amigos que han hecho de Valencia un hogar para mí. Gracias a mis amigas de la carrera que, aunque ya muy al final, nos encontramos en el camino y todavía seguimos en él. Gracias Susana por ser tan terremoto, por tu ambición por hacer cosas, por tu alegría, comprensión, por tu carisma. A Sandra por ser tan auténtica, por tus silbidos y tus “ai su mare”, por tu apoyo.

A mis amigas del camping (aunque yo no sea del camping) porque gracias a vosotras he estado y estoy muy agusto en Valencia. A Carla, Zaira, Patri, Carla, la pequeña Adriana y en especial a Sandra y a Andrea. Gracias Sandra por tu gran apoyo, por las risas y las conversaciones. Gracias por ese pequeñajo tan guapo y que quiero tanto. Gracias Sergio por que cada vez que estoy contigo es una renovación. Gracias Andrea, muchas muchas gracias, por estos más de 12 años juntas, porque siempre has estado y estarás ahí, por nuestros viajes, nuestras risas, nuestras conversaciones filosóficas, los enfados y nuestras tonterías. Gracias por esa preciosidad que me inunda de felicidad cada vez que la veo o hablo de ella. Gracias Amaia.

A mis compis de piso durante estos años, a Virginia, a Cristina y en especial a Rocio. Gracias Rocio por todo tu apoyo, por estar ahí.

A Bubi-Jackson y Marian, por vuestro apoyo y los momentos vividos en Valencia. A Duti y Marga, gracias por ser tan geniales y por todos los momentos vividos juntos!

A mis pajaritos, ya sean golondrias o tordachas de cola gris! Gracias a ese máster que nos unió. En menos de dos años nos hicimos inseparables y seguimos así. Por seguir juntándonos ya sea en Valencia, Madrid, Albacete, Londres, Gotemburgo, Italia...Porque sois únicas. Laurich muchas gracias por estar siempre ahí, por tu optimismo, por ser tan parecida a mí, por tus monólogos a las tantas de la mañana. A Albis, muchísimas gracias por tu apoyo, por todas las conversaciones, por nuestras riñas, por nuestro viaje a Argentina, por tu bondad, en definitiva gracias por ser como eres. No me imaginaría la vida sin vosotras.

A los de siempre, a mi gente, a mis raíces. Gracias a mis amigas de Albacete-Chinchilla que, aunque no estemos toda la vida juntas, lo parece. Gracias por vuestro carisma y vuestro apoyo porque con vosotras el tiempo nunca pasa. A la artista Mery, gracias por tu confianza, por tu apoyo, por controlar mis histerias, por ser tan divertida, por tus consejos. A Rocio, porque te lo he dicho mil veces, eres un ejemplo a seguir, por ser una luchadora, por estar siempre ahí cuando se te necesita y cuando no, por ser tan brillante y por tus momentos cómicos que recordamos siempre que tenemos ocasión. A Ester, por ser única, por tus consejos y reflexiones filosóficas, gracias por captar y reflejar en la portada de esta tesis el trabajo de estos años. A Marian, con la que me puedo pasar horas y horas y más horas hablando, gracias por ser un apoyo vital, por escucharme, por aconsejarme. A Marta, porque San Julián nos unió en matrimonio entre espuma, gracias por todos estos años de amistad. Porque a pesar de la

distancia seguimos, cuando nos volvemos a juntar, teniendo esa conexión. A mi amiga M^a Cruz, a la que siempre ha estado ahí desde los inicios, única e irrepetible, siempre apoyando siempre escuchando siempre aconsejando. Muchas gracias por todo.

A los de toda la vida, a ellos, a mis chicos. Gracias por aguantarme durante tantos años. Gracias por comprenderme y por apoyarme. A Miguel, concejal dimisión, por sus bromas. A Juanjo por estar ahí. A Adolfo por todo lo que hemos vivido. Por estar ahí desde los dos años, porque hemos tenido épocas de todo pero siempre intentando comprendernos y ayudarnos. Por presentarme a la persona más importante de mi vida. A Tana, qué decirte! Muchas gracias porque eres y serás uno de mis apoyos vitales. Has estado en todos los momentos de mi vida, tanto buenos como malos, siempre escuchando y apoyándome. A Valle, mil gracias por cuidar y querer a Tana, no imagino una persona mejor que tú. Gracias por ser tan única, con carácter, sensible y fuerte. Eres genial.

A ellas, al aquelarre, porque la familia no se elige pero si tuviese que hacerlo os elegiría una y cien mil veces a vosotras. Porque juntas somos una y nos complementamos. Caroline, gracias por tu sabiduría, por tus consejos. Isa, muchas gracias por ser tan genial, por aguantarme durante la escritura de la tesis todos los días, por darme a mi Dacoti, por ser mi gemel. A María, mi otro yo, mi hermana. Porque sólo contigo tienen sentido ciertas conversaciones, por ayudarme y apoyarme tanto, por enseñarme tantas cosas de la vida. A todas ellas, **I follow you.**

Gracias a mi familia. A mis tíos, tías, primos y primas. En especial a Merce y Borja por aguantar mis monólogos sobre la tesis y por darle a esta familia una personita que nos alegra la vida. Gracias Cloe. A mis abuelos y a mis abuelas. Gracias por todo el apoyo recibido durante toda mi vida. En especial a mi abuela Esperanza, porque es un ejemplo a seguir. Gracias por darnos tantas lecciones de la vida y por transmitirnos el sentido de la familia, de la unión.

Gracias a Emi y a Pepe, mis suegrs. Gracias por acogerme como si fuera una hija. Gracias por todos estos años, por vuestro apoyo.

Gracias a mis padres, y es que todo se lo debo a ellos. Gracias por darme la oportunidad de conseguir mis metas y de ayudarme a vivir la vida que he elegido. Gracias por todos estos años de ayuda tanto económica como apoyo moral. Sin vosotros nada de esto hubiese pasado. Esta tesis, en parte, es vuestra también.

Gracias a él. Gracias Carlos. Si te tuviese que dar las gracias por todo lo que me has enseñado, ayudado y apoyado tendría que escribir otra tesis aparte. Muchas gracias por ser fundamental en mi vida. Por tu generosidad, por tu pasión por las cosas que haces, por cuidarme, por saber lo que es una levadura, la ruta TOR y las tiorredoxinas. Por quererme y aguantarme tal como soy (que es difícil). Si de algo me siento orgullosa es de haber tomado, hace 14 años, la decisión más importante de mi vida. Gracias a mi tarica que también ha sufrido la escritura de esta tesis, gracias por dejarme achucharte, besarte y sacarte loca mientras canto.

Os quiero, no me imagino una vida sin vosotros.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Papel de las levaduras en el vino.....	3
1.1. Producción de vino.....	3
1.2. Características genéticas.....	4
1.3. Ciclo celular.....	6
1.4. Etapas de la Vinificación.....	6
1.4.1. Características del mosto de uva.....	6
1.4.2. Factores físico-químicos.....	7
1.4.3. Producción del inóculo, crecimiento celular y cinética de la fermentación.....	8
2. Respuesta al estrés en levadura.....	10
2.1. Respuesta general a estrés.....	10
2.1.1. Respuesta al estrés oxidativo.....	12
2.1.2. Otros tipos de estrés.....	14
2.2. Defensa antioxidantes en <i>S. cerevisiae</i>	19
2.2.1. Sistemas de detoxificación celular de las ROS.....	19
2.2.2. Componentes de protección y/o reparación.....	25
2.2.2.1. Sistema tiorredoxina.....	26
2.2.2.2. Sistema glutarredoxina.....	27
2.3. Regulación transcripcional de la respuesta a estrés oxidativo.....	28
3. Longevidad en levaduras.....	30
3.1. Tipos de longevidad.....	31
3.2. Complejo SAGA.....	35
3.3. Papel de la respuesta a estrés oxidativo.....	37
3.4. Señalización de nutrientes.....	38
3.4.1. Ruta Snf1p.....	38
3.4.2. Ruta Ras/cAMP/PKA.....	39
3.4.3. Ruta TOR/Sch9p.....	40
3.4.4. Respuesta retrógrada.....	42
3.4.5. Control General de Aminoácidos (GAAC).....	43
3.5. Autofagia.....	45
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y METODOS.....	51
1. Materiales.....	53
1.1. Cepas de microorganismos.....	53
1.2. Plásmidos.....	60
1.3. Oligonucleótidos.....	61
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	69
2.1. Bacterias.....	69
2.2. Levaduras.....	70
2.2.1. Crecimiento en condiciones de laboratorio.....	70
2.2.2. Crecimiento en condiciones de microvinificación.....	70

2.2.3. Condiciones de envejecimiento cronológico.....	71
2.2.4 Condiciones de autofagia.....	72
2.2.5. Medida de la resistencia a estrés.....	72
2.2.5.1. Formas de crecimiento.....	72
2.2.5.1.1. Goteos en placa.....	72
2.2.5.1.2. Halos de inhibición.....	72
2.2.5.1.3. Cultivo líquido.....	73
2.2.5.2. Agentes causantes de estrés.....	73
2.2.5.2.1. Estrés oxidativo.....	73
2.2.5.2.2. Estrés por temperatura.....	73
2.2.5.2.3. Estrés por etanol.....	73
2.2.5.2.4. Estrés por parada en la traducción.....	73
2.2.5.2.5. Estrés por ayuno de nitrógeno.....	73
3. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	74
3.1. Obtención de DNA.....	74
3.1.1. DNA plasmídico.....	74
3.1.2. DNA genómico de levadura.....	74
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	74
3.3. Obtención de RNA total de levadura.....	75
3.4. Transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) en dos pasos.....	76
3.5. Análisis de polisomas.....	76
4. Métodos de obtención y análisis de proteínas.....	76
4.1. Extracción de proteínas.....	76
4.1.1. Preparación de extractos para cuantificación de proteína mediante <i>Western blot</i>	77
4.1.2. Preparación de extractos proteicos para el estudio del proteoma redox tiólico.....	77
4.2. Co-Inmunoprecipitación de proteínas.....	78
4.3. Proteoma tiol redox.	79
4.4. Técnicas electroforéticas.....	80
4.4.1. Electroforésis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).....	80
4.4.2. Electroforésis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.....	80
4.4.3. Transferencia del gel (<i>Western blot</i>) e inmunodetección de proteínas.....	81
4.4.4. Revelado y cuantificación.....	83
4.5. Determinación de actividades enzimáticas.....	83
4.5.1. Catalasa.....	83
4.5.2. Zimogramas.....	83
4.5.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)	83
5. Medidas de parámetros bioquímicos.	83
5.1. Análisis de los parámetros enológicos.	83
5.1.1. Determinación de azúcares reductores.	83
5.1.2. Determinación de etanol.	84
5.1.3. Determinación de ácido acético, acetaldehído y glicerol.	84
5.2. Determinación de la capacidad fermentativa.	84
5.3. Análisis del metaboloma.	84
5.4. Análisis de los parámetros redox.	85
5.4.1. Cuantificación del glutatión.....	85
5.4.2. Cuantificación de trehalosa.	86

5.4.3. Medidas de las especies reactivas del oxígeno.	86
6. Métodos de manipulación de microorganismos.	87
6.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	87
6.2. Construcción de mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
6.3. Transformación de levadura.....	88
7. Técnicas microscópicas.	89
8. Tratamiento estadístico de los resultados.	89
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
1. Estudio del complejo transcripcional SAGA y su conexión con las rutas de señalización de nutrientes. Importancia de la mitocondria en longevidad cronológica.....	92
1.1. Papel del complejo SAGA en longevidad cronológica y autofagia.....	93
1.1.1. Las proteínas Ubp8p y Spt20p regulan la longevidad cronológica y autofagia.....	93
1.1.2. Papel de los componentes del complejo SAGA en la fermentación en mosto.....	96
1.1.2.1. Fermentación en Mosto sintético MS300.....	96
1.1.2.2. Fermentación en Mosto natural de la variedad tempranillo.....	98
1.1.3. Papel de las proteínas del complejo SAGA en diferentes condiciones de crecimiento.....	99
1.2. Interacción entre Gcn5p y la ruta de respuesta a la disponibilidad de nutrientes TORC1/Sch9p.....	101
1.2.1. Conexión entre Gcn5p y Sch9p y su papel en la regulación de la extensión de la longevidad cronológica.....	102
1.2.2. Identificación de <i>RGM1</i> como un potencial vínculo entre <i>GCN5</i> y <i>SCH9</i>	103
1.2.3. Estudio de la conexión de <i>RGM1</i> , <i>SCH9</i> y <i>GCN5</i> en mosto natural.....	107
1.3. Papel de la mitocondria en longevidad cronológica.	109
1.3.1. Estudio del impacto del genoma mitocondrial de <i>S. uvarum</i> y <i>S. cerevisiae</i> en híbridos interespecíficos.....	109
1.3.2. Papel del equilibrio nutricional y de la mitocondria en el control de la longevidad por Sch9p.....	112
1.3.3. Papel de la respuesta retrógrada en longevidad cronológica.....	115
1.3.3.1 Conexión de <i>GCN5</i> y <i>RTG2</i> y su papel en longevidad cronológica.....	121
1.3.3.2 Ruta de control general de aminoácidos y su relación con Rtg2p en longevidad.....	123
2. Análisis de la conexión entre <i>TSA1</i> y <i>GCN2</i> en longevidad cronológica.....	127
2.1. Conexiones entre la protein quinasa Gcn2p y las peroxirredoxinas en longevidad cronológica.....	128
2.1.1. Estudio de la longevidad cronológica en los mutantes de <i>TSA1</i> y <i>GCN2</i>	128
2.1.2. Estudio de la conexión entre la peroxirredoxina citosólica y Gcn2.....	131
2.1.3. Estudio de la conexión entre la peroxirredoxina nuclear Dot5p y Gcn2p.....	133
2.1.4. Estudio de la conexión entre la sulfirredoxina Srx1p y Gcn2p.....	135
2.1.5. Estudio del papel del factor transcripcional Gcn4p en longevidad cronológica durante la fermentación.....	136
2.1.6. Estudio de la conexión entre Gcn1p, activador de Gcn2p y Gcn2p en longevidad cronológica.....	137

2.2. Sensibilidad a estrés del doble mutante <i>gcn2Δtsa1Δ</i>	139
2.2.1. Sensibilidad a estrés oxidativo.....	139
2.2.2. Respuesta a la disponibilidad de nitrógeno.....	141
2.2.2.1. Goteos en placa con diferentes suplementos de aminoácidos.....	141
2.2.2.2. Goteos en placa con diferentes compuestos inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos.....	142
2.2.2.3. Goteos en placa con rapamicina para la inhibición de <i>TORC1</i>	144
2.2.2.4. Efecto de las deleciones de <i>TSA1</i> y <i>GCN2</i> en autofagia.....	145
2.2.2.5. Estudio de la expresión de genes de respuesta a la disponibilidad de nitrógeno.....	146
2.3. Conexión bioquímica entre <i>GCN2</i> y <i>TSA1</i>	152
2.3.1. Estudio de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2α.....	152
2.3.1.1. Efecto de compuestos químicos inductores de la actividad de Gcn2p en la fosforilación de eIF2α.....	152
2.3.1.2. Fosforilación de eIF2α durante la vinificación en mosto sintético.....	153
2.3.2. Estudio de la traducción global mediante perfil de polisomas.....	154
2.3.3. Estudio de la sulfinilación de Tsa1p.....	157
2.3.4. Estudio del crecimiento en diferentes fuentes fermentables y/o respirables.....	160
2.3.4.1. Goteos en placa con diferentes fuentes de carbono.....	160
2.3.4.2. Viabilidad y consumo de etanol en <i>gcn2Δtsa1Δ</i>	163
2.3.5. Estudio de mutantes puntuales en las cisteínas catalíticas de Tsa1p y su conexión con <i>GCN2</i>	164
2.3.5.1. Longevidad cronológica en medio SC.....	164
2.3.5.2. Goteos en placa con diferentes fuentes de carbono en cepas de laboratorio.....	165
2.4. Interacción de la ruta de señalización de respuesta a nutrientes PKA con el control general de aminoácidos y la respuesta a estrés.....	167
3. Papel de la tioredoxina reductasa en el envejecimiento y en la respuesta a nutrientes....	177
3.1. Respuesta a estrés oxidativo del mutante <i>trr1Δ</i> en cepas vínicas.....	177
3.1.1. Crecimiento en placa en presencia de peróxido de hidrógeno.....	177
3.1.2. Medida de las especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo.....	179
3.1.3. Niveles de Glutatión.....	180
3.1.4. Niveles de actividad catalasa.....	182
3.2. Crecimiento y longevidad cronológica del mutante <i>trr1Δ</i> en cepas vínicas.....	183
3.3. Interacción entre <i>TRR1</i> y <i>TOR1</i> y su papel en el envejecimiento cronológico.....	186
3.3.1. Crecimiento de los mutantes del sistema TRX en presencia de rapamicina.....	186
3.3.2. Crecimiento de los mutantes del sistema TRX y en <i>TOR1</i> en presencia del agente reductor DTT.....	188
3.3.3. Medida de ROS en el mutante <i>trr1Δ</i> en presencia de rapamicina.....	189
3.3.4. Influencia de la conexión <i>TOR1-TRR1</i> en el crecimiento y en la longevidad.....	189
3.3.5. Respuesta a la inhibición de la síntesis de aminoácidos.....	192
3.3.6. Crecimiento en presencia de cafeína.....	195
3.3.7. Autofagia.....	197
3.3.8. Fosforilación de Rps6p.....	198
3.4. Interacción entre <i>GTR1-TRR1</i>	199
3.4.1. Interacción entre <i>TRR1</i> y <i>GTR1</i> y su impacto en la longevidad cronológica.....	200
3.4.2. Interacción entre <i>TRR1</i> y <i>GTR1</i> y crecimiento en rapamicina.....	200

4. Estudio global del sistema tiorredoxina y de sus implicaciones en longevidad cronológica.....	204
4.1. Respuesta al estrés oxidativo.....	205
4.1.1. Crecimiento en medios con agentes oxidantes y reductores.....	205
4.1.2. Niveles de glutatión y catalasa.....	206
4.2. Estudios de crecimiento y longevidad y su relacion con en el sistema tiorredoxina	210
4.2.1. Envejecimiento cronológico en los mutantes TRX en medio de laboratorio.....	210
4.2.2. Crecimiento y envejecimiento cronológico en los mutantes TRX en mosto sintético.....	213
4.2.3. Envejecimiento cronológico en mosto natural. Variedad tempranillo.....	213
4.3. Caracterización proteómica del doble mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i>	215
4.3.1. Proteoma redox tiólico.....	216
4.3.1.1. Análisis de las cisteínas oxidadas reversiblemente.....	216
4.3.2. Actividad de las superóxidos dismutasas en el mutante de las tiorredoxinas.....	220
4.3.3. Glutacionilación de Sod1p.....	221
4.4. Estudio del Proteoma Global.....	225
4.4.1. Comparación de proteomas silvestre y mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i> en las cuatro condiciones de crecimiento.....	225
4.4.2. Comparación de proteomas silvestre y mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i> en fase exponencial en medio mínimo completo SC.....	228
4.4.3. Comparación de proteomas silvestre y mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i> en fase estacionaria en medio mínimo completo SC.....	232
4.4.4. Comparación de proteomas silvestre y mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i> en condiciones de envejecimiento cronológico.....	239
4.4.5. Comparación de proteomas silvestre y mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i> en fase exponencial en medios con 2% de glucosa.....	242
4.4.6. Estudio del proteoma y del metaboloma comparados del mutante <i>trx1Δtrx2Δ</i> y de la cepa silvestre en mosto sintético.....	237
4.4.6.1. Metabolismo de las hexosas.....	254
4.4.6.2. Ciclo de Krebs.....	263
4.4.6.3. Ruta de las pentosas fosfato.....	266
4.4.6.4. Metabolismo de las bases nitrogenadas.....	267
4.4.6.4.1. Bases púricas.....	267
4.4.6.4.2. Bases pirimidínicas.....	268
4.4.6.5. Metabolismo del NAD.....	269
4.4.6.6. Metabolismo de lípidos.....	271
4.4.6.7. Metabolismo de glutatión.....	274
4.4.6.8. Metabolismo del azufre.....	276
4.4. Comparación entre el análisis del metaboloma del <i>trx1Δtrx2Δ</i> y <i>ttr1Δ</i>	278
CONCLUSIONES.....	288
BIBLIOGRAFÍA.....	292

ABREVIATURAS

3AT: 3-amino-1, 2,4-triazol

AC: Adenilato ciclasa

ADH: Aldehído deshidrogenasa

ALS: Acetolactato sintasa

ALS: Esclerosis lateral amiotrófica

cAMP: Aminoacil monofosfato cíclico

ATP: Adenosina trifosfato

DO: Densidad óptica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNS: Ácido 3,5- dinitrosalicílico

dNTPs: Desoxiribonucleótidos trifosfato

DTNB: Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico

DT: Desviación típica

DTT: Ditioneitol

EDTA: Sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético

ERCs: Extrachromosomal rDNA circles (círculos extracromosomales de DNA ribosomal)

GAAC: General aminoacids control (control general de aminoácidos)

GPX: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GRX: Glutarredoxina

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GSSP: Glutación unido a proteína

GST: Glutación transferasa

HOG: High osmolarity glicerol (Elevada osmoralidad por glicerol)

HSE: Heat shock element (Elemento de respuesta a choque térmico)

HSF: Heat shock factor (Factor de choque térmico)

HSP: Heat shock protein (Proteína de choque térmico)

LC: Longevidad cronológica

LR: Longevidad replicativa

LSA: Levadura seca activa

mA: miliamperio

MES: Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MSX: Sulfoximin-L-metilamina

mRNA: RNA mensajero

mV: Milivoltios

NAD⁺: Nicotín adenín dinucleótido oxidado

NADH: Nicotín adenín dinucleótido reducido

NADPH: Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido

NCR: Nitrogen Catabolite Represión (Represión por catabolito del nitrógeno)

NES: Nuclear export signal (Señal de exportación nuclear)

NLS: Nuclear localization signal (Señal de localización nuclear)

p/v: peso/volumen

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)

pb: Pares de bases

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PKA: Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico

PMSF: Fluoruro de fenilmetil sulfonilo

PUFA: Polyunsaturated fatty acid (Ácido graso poliinsaturado)

PRX: Peroxirredoxina

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

RT-qPCR: Real Time quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa)

rRNA: RNA ribosómico

SDS: Dodecil sulfato sódico

SFA: Saturated fatty acid (Ácido graso saturado)

SM: Sulfometurón metil

SOD: Superóxido Dismutasa

STRE: Stress responsive element (Elemento de respuesta a estrés)

TCA: Ácido tricloroacético

TFA: Ácido trifluoroacético

TOR: Target of rapamycin (Diana de rapamicina)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

TRX: Tiorredoxina

U: Unidad

v/v: Volumen/volumen

YAP: Yeast AP-1 (Proteína activadora 1 de levadura)

YRE: Yap response element (Elemento de respuesta a la proteína activadora 1 de levadura)

INTRODUCCIÓN

1. PAPEL DE LAS LEVADURAS EN EL VINO

La producción de vino es un proceso que se ha realizado desde la antigüedad. Las primeras evidencias datan la existencia de bebidas producidas por fermentación en el neolítico, alrededor de 7000 a. C. al sur del Cáucaso (McGovern et al., 2004), en base a la detección de ácido tartárico en una tinaja en Mesopotamia y en Grecia, ambos restos fechados alrededor del año 5000 a. C. (Sicard and Legras, 2011). Desde ese momento se cree que la tecnología de la fermentación se expandió desde Mesopotamia al resto del mundo. En el caso de España fueron los romanos los que introdujeron la producción de vino en la región mediterránea (Pretorius, 2000).

El ser humano ha utilizado de manera inconsciente la levadura para la producción de vino. En 1850 Louis Pasteur, padre de la microbiología, empezó a trabajar en la fermentación alcohólica ya que era un proceso sumido en confusión y controversia. Muchos científicos aseguraban que la fermentación y la putrefacción no estaban causadas por microbios vivos. Entre 1855 y 1875 Pasteur estableció tres conceptos: el primero, el papel de la levadura en la fermentación alcohólica; el segundo, que la fermentación es un fenómeno fisiológico y el tercero, que hay diferencias entre el crecimiento aeróbico y anaeróbico de las levaduras. Fue en 1860 cuando finalmente describió por primera vez el papel de las levaduras en la fermentación alcohólica y en 1862 que las levaduras podrían encontrarse en diferentes frutos de alta acidez donde también crecían bacterias (Barnett, 2000).

1.1 Producción de vino

La fermentación del mosto es un proceso microbiológico muy complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Amerine, 1960; Henick-Kling, 1988). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido identificada como el principal microorganismo responsable de la fermentación de los azúcares del mosto de uva y la bacteria *Oenococcus oeni* como la responsable de la fermentación maloláctica, importante para algunos tipos de vino (Borneman et al., 2013). Tradicionalmente, la producción de vino se ha llevado a cabo utilizando cepas de levadura procedente de la superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas. Las levaduras alcanzan las uvas por el efecto de diseminación del viento y de los insectos y están presentes en las viñas desde el inicio de la maduración del fruto. Las especies predominantes (entre un 50%-75%) en la superficie de la uva corresponden al género *Hanseniaspora* (anamorfo *Kloeckera*) y, en menor proporción, a los géneros *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Hanselula* (Fleet, 1998).

También se pueden encontrar, aunque no siempre, especies de otros géneros como *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera* y *Schizosaccharomyces* (Fleet, 2003). Las levaduras encontradas durante las primeras horas de llenado de los depósitos corresponden a los mismos géneros identificados en la uva, con un predominio de *Hanseniaspora*.

En estas condiciones de vinificación espontánea, levaduras del género *Saccharomyces*, y principalmente de la especie *S. cerevisiae*, empiezan a desarrollarse tras las primeras 20 horas, coexistiendo con las levaduras procedentes de la uva, y llegando a predominar a partir de los 3-4 días de fermentación, para acabar siendo las responsables últimas de la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Este cambio poblacional está relacionado fundamentalmente con el aumento progresivo de concentración de etanol así como con otros factores característicos de la vinificación, como las condiciones de anaerobiosis, el sulfitado del mosto tras la vendimia, la cantidad de azúcar y la mayor tolerancia a temperaturas más altas que presenta *S. cerevisiae* frente a otras levaduras (Fleet, 1998). Estudios cuantitativos del crecimiento de levaduras durante la fermentación revelaron poblaciones de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) de especies no-*Saccharomyces* en las primeras etapas del proceso, biomasa suficiente para influir en la composición del vino. Muchos estudios realizados en diferentes regiones vitivinícolas del mundo han confirmado la importante contribución de las especies no-*Saccharomyces* a la cinética global de crecimiento durante la fermentación del vino tanto espontánea como inoculada (Combina et al., 2005; Zott et al., 2008). Actualmente se están realizando estudios del uso de levaduras vínicas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* como iniciadores mixtos o multi-*starters* como una herramienta muy útil para mejorar el perfil aromático, dar complejidad sensorial y estabilidad colorimétrica al vino (Ciani et al., 2010; Comitini et al., 2011; Rojas et al., 2003; Romano et al., 2003).

En la actualidad, la estrategia habitual para llevar a cabo la producción del vino implica la inoculación en el mosto de levaduras seleccionadas en forma de levadura seca activa (LSA), práctica que empezó a desarrollarse en los años sesenta del siglo pasado. Este método de inoculación permite una disminución de la fase de latencia, asegura una rápida y completa fermentación del mosto y conduce a un grado importante de reproducibilidad en el producto final año tras año (Fleet and Heard, 1993; Pretorius, 2000). La selección de levaduras vínicas con marcadores específicos ha proporcionado un sistema para monitorizar de forma precisa el crecimiento de cepas particulares durante la fermentación y demostrar que las levaduras inoculadas son las principales responsables del proceso aunque, en algunos casos, la levadura seleccionada no se implanta al 100% (Esteve-Zarzoso et al., 2010). La levadura utilizada como inóculo debe ser cuidadosamente seleccionada, debe conducir fermentaciones vigorosas y reproducibles con cortas fases de latencia, no dejar azúcares residuales, ser tolerantes a condiciones de estrés como elevadas presiones, etanol, temperaturas no óptimas y producir β -glicosidasa y glicerol para conseguir un buen aroma. Otras características deseables son: la capacidad de fermentar a bajas temperaturas, la baja producción de espuma, el carácter *killer*, la presencia de ciertas actividades enzimáticas, etc.

1.2 Características genéticas

Debido a su importancia en distintas fermentaciones alimentarias, *S. cerevisiae* es la levadura por excelencia. Desde el punto de vista taxonómico, pertenece al reino Fungi, filum *Ascomycota*, subfilum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae* y, como ya se ha dicho, al género *Saccharomyces*.

Dentro de este género *Saccharomyces* se clasifican otras 6 especies, *S. kudriavzevii*, *uvarum*, *paradoxus*, *mikatae*, *arboricolus* y *eubayanus* (Borneman and Pretorius, 2015; Hittinger, 2013). Además, se han descrito varios tipos de híbridos entre algunas de las especies del género, *S. cerevisiae*-*S. kudriavzevii* (González et al., 2008; Peris et al., 2012), *S. cerevisiae*-*S. uvarum* (Rainieri et al., 2006) y *S. pastorianus*, híbrido interespecífico entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011; Peris et al., 2016).

Las cepas industriales han ido evolucionando a partir de nichos y ambientes ecológicos proporcionados por las actividades humanas (Naumov et al., 2000). Este proceso de domesticación, similar al de plantas y animales en la agricultura y ganadería tradicionales, podría ser responsable de las características específicas de las levaduras industriales que se detallan a continuación (Pretorius, 2000). La especialización ha sido asociada con algunas de sus características genómicas, como el genoma mayoritariamente diploide aunque con presencia de aneuploidias o poliploidias, el alto grado de polimorfismo, el homotalismo (Mortimer et al., 1994; Querol et al., 2003), etc. Además, las levaduras industriales se caracterizan por la alteración en el número de copias de una serie de genes (duplicaciones y deleciones), que ha sido denominada la firma de la levadura industrial (Dunn et al., 2005). Recientemente la secuenciación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* ha revelado la presencia de transferencia horizontal de genes que podrían estar relacionados con la adaptación al ambiente industrial (Novo et al., 2009).

Las cepas de *S. cerevisiae* que son usadas normalmente en los laboratorios descienden de aislados naturales. Contienen, de forma artificial, auxotrofías para algunos aminoácidos y/o bases nitrogenadas mientras que las industriales son protótrofas, es decir, no necesitan de ningún requerimiento en forma de aminoácidos o nucleótidos para su crecimiento. Esto plantea una importante diferencia en cuanto a las posibilidades de manipulación genética de las cepas industriales. En el caso de las cepas de laboratorio, su transformación es posible utilizando marcadores de selección que restauren la prototrofia para alguno de los requerimientos, mientras que en el caso de las vínicas, es necesaria la introducción de auxotrofías previamente a su transformación o ha de recurrirse al uso, como marcadores de transformación, de genes de resistencia a antibióticos, como la cicloheximida (del Pozo et al., 1991) o la geneticina (Hadfield et al., 1990). Las cepas de laboratorio son haploides o diploides y presentan longitudes cromosómicas bien definidas. En cambio, las cepas vínicas son mayoritariamente diploides, poliploides o incluso aneuploides (Bakalinsky and Snow, 1990; Codón et al., 1994). Además, muestran un alto nivel de polimorfismo de la longitud cromosomal (Bidenne et al., 1992; Rachidi et al., 1999), que determina una alta variabilidad en su capacidad de esporulación y también en la viabilidad de las esporas, que suele ser baja. Esta diferencia también condiciona las posibilidades de manipulación genética de las levaduras vínicas, dado que para conseguir una deleción génica es necesario eliminar secuencialmente dos copias del gen, al menos.

1.3 Ciclo celular

S. cerevisiae puede multiplicarse tanto asexualmente por multiplicación vegetativa, como sexualmente a través de ascosporas. Las levaduras vínicas son mayoritariamente homotálicas (HO), es decir, después de un proceso de esporulación, las células derivadas de la división celular puedan cambiar de sexo, conjugarse con otra célula de tipo sexual opuesto y formar, finalmente, una célula con doble contenido de DNA y homocigótica para todos los genes excepto para el locus MAT. Por el contrario, en cepas heterotálicas (ho) el locus MAT es estable y las células permanecen en estado haploide hasta encontrar otro tipo sexual distinto con el que conjugarse. Las cepas vínicas muestran una elevada tasa de heterocigosis (Codón et al., 1994), que incluye el locus HO. Presentan capacidad de reorganizar sus cromosomas durante el crecimiento mitótico (Puig et al., 2000), característica no observada en cepas haploides de laboratorio.

Bajo condiciones óptimas *S. cerevisiae* crece vegetativamente, que es el modo de reproducción típico de levaduras ascomicetes. La división celular en la reproducción vegetativa sigue un ciclo celular mitótico estándar en el que, una vez completada la mitosis y el núcleo y los orgánulos están en la gema, comienza la citoquinesis y se forma el septum en el límite entre la célula hija y la madre.

1.4 Etapas de la Vinificación

1.4.1 Características del mosto de uva

El mosto de uva es un medio complejo que contiene, en mayor o menor medida, todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de *S. cerevisiae*. La vinificación es un proceso discontinuo de tipo *batch*, donde todos los nutrientes se encuentran en el medio de cultivo desde el principio y su concentración disminuye conforme al consumo que haga la levadura de cada uno de ellos. Los componentes mayoritarios del mosto de uva son los monosacáridos, concretamente las hexosas, glucosa y fructosa, en una proporción básicamente equimolecular, aunque también existen otros azúcares en menor proporción. La concentración total de azúcares generalmente es de entre 170 y 220 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Niveles extremos de entre 250 y 300g/L pueden producir la inhibición del crecimiento debido a la alta presión osmótica y la elevada concentración de etanol que producen. Los segundos compuestos en abundancia son los ácidos orgánicos, entre 9 y 27 g/L (Ough, 1992), siendo el tartárico y el málico los más abundantes (90%) y, en menor cantidad, cítrico y ascórbico.

Uno de los factores más importantes de la composición del mosto es el contenido en nitrógeno, ya que suele ser un nutriente limitante para el crecimiento de *S. cerevisiae*, y su agotamiento es la principal causa de paradas en la fermentación. La concentración de nitrógeno soluble varía entre 0.1 y 1g/L. El contenido de nitrógeno en el mosto se compone de: amonio (3-10%), aminoácidos (25-30%), polipéptidos (25-40%) y proteínas (5-10%).

Las especies de *Saccharomyces* son incapaces de asimilar nitrógeno inorgánico en el medio (como nitratos y nitritos), y tampoco puede utilizar proteínas y polipéptidos, ya que carecen de sistemas de digestión extracelular de este tipo de compuestos, por lo que el crecimiento depende, fundamentalmente de la cantidad de amonio y de aminoácidos, que son las fuentes preferidas de nitrógeno. Los aminoácidos más abundantes del mosto suelen ser la prolina (que en condiciones de falta de oxígeno no es metabolizada por la levadura) y la arginina, aunque la proporción de cada uno varía mucho entre diferentes tipos de mostos. Una concentración por debajo de 140mg/L de nitrógeno asimilable dificulta la fermentación en presencia de una cantidad normal de azúcar y una concentración de amonio por debajo de 25mg/L no es deseable. Para paliar esta deficiencia de nitrógeno se utiliza una sal de amonio, generalmente sulfato o fosfato de diamonio que se debe añadir al principio o en las primeras fases de la fermentación ya que si se añade en la parada de la fermentación, las células no podría asimilarlo por deficiencia en el transporte debida a los efectos del etanol sobre la fluidez de la membrana.

La biotina, vitamina que las levaduras no pueden sintetizar, también está presente en el mosto de uva y es importante para su crecimiento. Otros compuestos importantes son los polifenoles (sobre todo las quinonas) de importancia organoléptica y con actividad antioxidante (Carrascosa et al., 2005).

1.4.2 Factores físico-químicos

La temperatura es el factor más importante desde el punto de vista del crecimiento de las levaduras y del avance de la fermentación. La temperatura óptima de crecimiento de la levadura es 30°C, la cual no es la óptima para la fermentación del mosto ya que al aumentar la temperatura de la fermentación, aumenta la toxicidad del etanol y se evaporan compuestos volátiles de importancia en el vino. La temperatura también es importante para la maduración de la uva tanto fenólica, madurez de los compuestos polifenoles (taninos y antocianos) que influyen en el sabor, color y aroma del vino, como alcohólica, madurez de los azúcares de la uva que determinará el grado alcohólico de los vinos. Con el aumento de temperaturas debido al cambio climático la maduración alcohólica de las uvas ocurre antes que la fenólica por lo que no se consigue el tipo de vino que se pretende comercializar. Para solventar el problema se realizan una serie de modificaciones como determinar el mejor momento para recolectar la uva y cada vez más, se realizan fermentaciones a bajas temperaturas, 12-13 °C. Estas fermentaciones a bajas temperaturas se realizan en los vinos blancos y rosados produciendo una mayor cantidad de compuestos aromáticos (ésteres) y una menor producción de compuestos no deseados (alcoholes superiores y ácido acético). No es el caso de los vinos tintos ya que requieren temperaturas más altas (22-28°C) para la extracción de compuestos fenólicos de la piel de la uva. Otro factor físico químico importante es la aireación. *S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo y es capaz de consumir azúcares en ausencia de oxígeno mejor que otras levaduras no-*Saccharomyces* en las que el oxígeno puede inhibir la fermentación, efecto que se conoce como efecto Pasteur.

No obstante, cierta cantidad de aire es beneficiosa para el crecimiento de las levaduras vínicas por la necesidad de O_2 para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides (ergosterol) para las membranas. En la industria se lleva a cabo la aireación del vino que se denomina el remontado. Una aireación excesiva puede llevar a la producción de acetaldehído y SH_2 , productos no deseables en el vino. El pH del mosto oscila entre 2.75 y 4.2. Este carácter ácido del mosto permite, por un lado, favorecer la hidrólisis de disacáridos, fundamentalmente sacarosa en glucosa y fructosa, y por tanto la fermentación, y por otro, prevenir la proliferación de microorganismos alterantes. Por último el CO_2 que, junto con el etanol, es uno de los productos de la fermentación alcohólica. La liberación de este gas sirve para disipar parte del calor y para producir corrientes de convección en el mosto que permiten la difusión de nutrientes (Carrascosa et al., 2005).

1.4.3 Producción del inóculo, crecimiento celular y cinética de la fermentación

En términos generales, el proceso de la vinificación se inicia con un estrujado del grano de uva, generando lo que se conoce como mosto o zumo de uva, que se deposita en grandes tanques junto con el inóculo formado por levaduras iniciadoras, generalmente en forma de LSA. La propagación de levaduras se lleva a cabo sobre melazas procedentes del refinamiento del azúcar de remolacha o de la caña, ya que tienen un elevado contenido en sacarosa y un bajo coste económico por tratarse de un subproducto de desecho industrial. Sin embargo, al carecer de ciertos requerimientos nutricionales (nitrógeno, sales, etc.) deben ser suplementadas.

Para producir biomasa de levadura se realiza un crecimiento previo a escala de laboratorio que es utilizado para inocular el primer fermentador y se va escalando en una secuencia de fermentadores hasta obtener la cantidad deseada. La biomasa producida al final del proceso sufre una etapa de maduración que puede durar entre 1 y 5 días, donde se consumen completamente los nutrientes, existe una leve aireación, se elimina la agitación de manera que, las células no se dividen, están en una fase estacionaria y sedimentan.

Esta biomasa se deshidrata con el fin de producir la LSA donde la temperatura y la velocidad de secado juegan un papel importante para la resistencia de la levadura a la deshidratación y posterior rehidratación. Estudios previos de nuestro laboratorio se han centrado en la caracterización a nivel molecular del comportamiento de las levaduras vínicas durante los procesos de producción de biomasa (Gómez-Pastor et al., 2012a, 2010; Pérez-Torrado et al., 2005, 2009) y de deshidratación (Garre et al., 2010) en particular de la respuesta al estrés oxidativo, y en el uso de otras levaduras *no-Saccharomyces* (Gamero-Sandemetrío et al., 2014; 2015). Una vez rehidratada la LSA, el proceso fermentativo comienza con la adición al mosto de uva del inóculo de levadura, aproximadamente 10^6 células/mL. En la Figura 1.1 se muestra la curva de crecimiento típica de *S. cerevisiae* en mosto de uva que comienza con un corto periodo de latencia (Lafon-Lafourcade, 1982). En la primera fase se produce un crecimiento limitado que dura entre 2 y 5 días y conduce a un aumento de la población hasta 10^7 - 10^8 células/mL.

En esta fase la velocidad de fermentación es máxima y constante y suele consumirse entre una tercera parte y la mitad de la cantidad total de azúcares en el mosto (Castor, 1953). A continuación, el crecimiento entra en una fase quasi-estacionaria que dura alrededor de 8 días durante la cual no se produce un aumento del número de células de la población y supone alrededor del 80% del proceso total de la fermentación. A pesar de que no hay un aumento en el número de células, las células se encuentran metabólicamente activas y la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo. Finalmente el cultivo entra en una fase de muerte de hasta varias semanas durante la cual el número de células viables decrece progresivamente. La pérdida de la capacidad fermentativa durante esta fase está relacionada con una depleción de ATP y la acumulación de etanol y otros compuestos de dos carbonos que producen efectos negativos sobre la capacidad de transporte de la membrana. Una vez terminada la fermentación, se eliminan las levaduras.

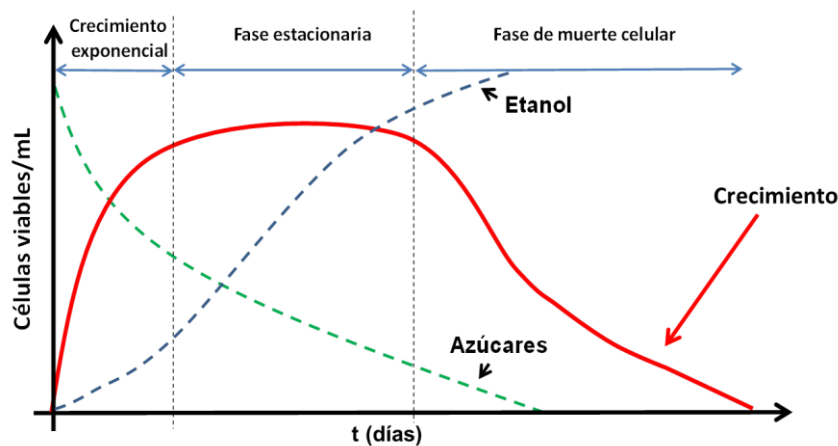


Figura I.1 Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica del mosto de uva.

En la producción de la mayoría de vinos tintos de calidad se lleva a cabo la fermentación maloláctica, que la realiza principalmente la especie de bacteria láctica *Oenococcus oeni* (Alexandre et al., 2001). La lisis celular que acompaña a la muerte de las levaduras al final de la fermentación alcohólica favorece el crecimiento de estas bacterias. En la industria se utilizan, para activar la fermentación maloláctica, nutrientes o activadores que están formados por levaduras inactivas y sustancias como la caseína y la celulosa. En esta segunda fermentación, se produce la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico. Esto permite la disminución de la acidez total del vino así como un cambio en la calidad organoléptica ya que el sabor astringente del ácido málico resulta remplazado por otro más suave, el del láctico.

Como ya se ha mencionado, aproximadamente las dos terceras partes finales del proceso de fermentación vínica discurren sin división celular pero las levaduras siguen metabólicamente activas y produciendo muchos compuestos enológicos deseables.

Introducción

El cese de la división celular es debido, fundamentalmente, al agotamiento de uno o más nutrientes, lo que provoca una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos que marcan la entrada del cultivo en la llamada fase estacionaria. Dichos cambios incluyen la acumulación de glucógeno, engrosamiento de la pared celular y mayor resistencia frente a diferentes condiciones de estrés, que aseguran la supervivencia durante las épocas de carencia.

En contraste con lo que ocurre en medios de laboratorio, la parada de la división celular en la fermentación vínica ocurre en presencia de grandes cantidades de azúcares (entre 100-150g/L) ya que son otros nutrientes, como los compuestos nitrogenados, los primeros en agotarse, provocando la parada de la división (Fleet and Heard, 1993). El efecto nocivo del etanol sobre la membrana plasmática es también un factor importante, ya que altera tanto la fluidez como la permeabilidad de la misma (Herman, 2002). Este efecto produce una disipación del gradiente de protones a través de la membrana lo cual priva de fuerza motriz a numerosos sistemas de transporte de la membrana, especialmente de compuestos nitrogenados, exacerbando así la carencia de estos nutrientes.

La entrada en la fase estacionaria se ha descrito a nivel molecular en condiciones de laboratorio (Herman, 2002). Existen dos rutas de transducción de la señal que la controlan, las denominadas rutas Ras/PKA y ruta TOR que se describirán en el siguiente apartado. Ambas ejercen un control general de la proliferación celular y responden coordinadamente a la abundancia de nutrientes favoreciendo la división celular y reprimiendo la respuesta a estrés. Cuando los nutrientes escasean, estas rutas bloquean la proliferación celular y permiten la activación de los mecanismos de respuesta a estrés.

2. RESPUESTA AL ESTRÉS EN LEVADURAS

En muchas circunstancias las levaduras están sometidas a diferentes tipos de estrés. A continuación se describen los diferentes tipos de estrés presentes durante la fermentación de los azúcares para producción de vino, así como en condiciones de envejecimiento en medios de laboratorio.

2.1 Respuesta general a estrés

La supervivencia de las células depende de su capacidad para detectar y responder adecuadamente a alteraciones en el ambiente. La levadura *S. cerevisiae* se adapta a estas nuevas situaciones ambientales a través de mecanismos de respuesta a estrés que protegen a la célula frente a los diferentes tipos de estrés y frente al posible daño celular. Además, se ha observado que las células pueden adquirir una protección cruzada que consiste en la adquisición de resistencia y tolerancia a un estrés diferente al que se ha sometido la célula. Un ejemplo de esta protección cruzada son las proteínas de choque térmico, que se han observado inducidas bajo condiciones de estrés por ayuno de nitrógeno o la inducción por choque térmico del gen que codifica para la catalasa citosólica *CTT1* (Estruch, 2000).

Estos mecanismos de respuesta interconectados permiten a la célula una disminución del gasto energético en presencia de estrés. Los genes que regulan su inducción en respuesta a diferentes tipos de estrés, tienen en su promotor unas secuencias que se conocen como Elementos de Respuesta a Estrés, o “Stress Response Elements”, STRE.

Las secuencias STRE permiten la inducción de una gran familia de genes en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental o metabólico, lo que se traduce en una activación transcripcional y esta, a su vez, en la adquisición de tolerancia a cualquier estrés. La expresión de muchos genes inducidos por estrés es inhibida a través la ruta PKA-AMPC, descrita en muchos procesos celulares incluyendo la captación de nutrientes, la regulación de la proliferación celular, el almacenaje de carbono y la respuesta a estrés. La secuencia consenso STRE tiene un núcleo con secuencia conservada AGGGG, que ha sido identificado en más de 180 genes de respuesta a estrés, como por ejemplo, los genes de las enzimas de la biosíntesis de trehalosa (*TPS1*, *TPS2*, *TPS3* y *TLS1*), es funcional en las dos orientaciones (CCCCT o AGGGG) y responde a represión por la ruta PKA-AMPC. En los promotores de muchos genes de respuesta a estrés, se han identificado también otras secuencias, como el denominado Elemento de Choque Térmico o “Heat Shock Element”, HSE. Se ha escrito una relación entre ambas secuencias de respuesta a estrés, STRE y HSE, que es dependiente de gen de manera que, en algunos genes, ambas secuencias actúan de manera redundante mientras que, en otros, lo hacen aditivamente.

Dos factores de transcripción que están relacionados con la expresión génica mediada por los elementos STRE son Msn2p y Msn4p. Estos factores fueron identificados en respuesta a diferentes tipos de estrés (Martinez-Pastor et al., 1996). *MSN2* codifica para una proteína con dedos de Zinc (C_2H_2) y se aisló como un supresor en multicopia del defecto en la utilización de rafinosa de mutantes termosensibles en la protein quinasa *SNF1*. La sobreexpresión de *MSN4* también suprime el defecto de dichos mutantes, y ambos factores de transcripción se consideran parcialmente redundantes. Msn2/4p reconocen y se unen a las secuencias STRE *in vivo* e *in vitro* y son requeridos para la inducción del gen reportero *STRE-LEU2-LacZ* en respuesta a estrés por choque térmico, bajo pH, ácido sórbico y concentraciones altas de etanol. Msn2/4p son activados por diferentes tipos de estrés e inducen la transcripción de una batería de genes que contienen la secuencia STRE. En ausencia de estrés, Msn2/4p están distribuidos por el citoplasma y parcialmente excluidos del núcleo mientras que después de un tratamiento de estrés, ambas proteínas se acumulan en el núcleo. Dos rutas están regulando la respuesta a estrés de estos factores. Por un lado, la activación de la ruta PKA dirige la exclusión de Msn2/4p del núcleo mientras que la localización nuclear se favorece cuando la ruta está inactivada (Görner et al., 1997). Por otra parte, La ruta TOR, o “Target Of Rapamycin” también ejerce regulación sobre la localización subcelular de estos factores transcripcionales, de manera que la inactivación de la ruta, por ejemplo por tratamiento con rapamicina, induce la acumulación de Msn2/4p en el núcleo. Existen otros elementos relacionados con la respuesta a condiciones de estrés más específicas, como son ARE/Yap1 (relacionado con el estrés oxidativo) que se comentarán a lo largo de esta Introducción. Estos elementos podrían conferir protección frente a un estrés medio, siendo necesaria la expresión de los factores de transcripción Msn2/4p para responder a un estrés más severo.

2.1.1 Respuesta al estrés oxidativo

Todos los organismos eucariotas poseen un metabolismo dependiente del oxígeno ya que, a lo largo de la evolución, ésta molécula se ha seleccionado de forma mayoritaria como aceptora final de electrones en la respiración. La consecuencia es que todos los organismos aeróbicos están sometidos a la llamada paradoja del oxígeno (Davies, 1995) ya que dependen de él para su supervivencia durante la respiración celular pero, al mismo tiempo, su poder oxidante da lugar a compuestos citotóxicos, denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS). El estrés oxidativo tiene lugar cuando la concentración de estos oxidantes supera la capacidad de tamponamiento redox de las células, es decir, cuando se pierde el equilibrio entre la producción de radicales libres y la acción de los sistemas antioxidantes que los contrarrestan. Las especies reactivas del oxígeno son una variedad de moléculas derivadas del oxígeno molecular mientras que los radicales libres son especies con uno o más electrones desapareados (Halliwell, 2006). A pesar de que el oxígeno molecular contiene dos electrones desapareados, no es muy reactivo ya que los dos electrones tienen el mismo espín. Cuando uno de los electrones desapareados es excitado y cambia su espín, la especie resultante pasa a ser un oxidante potente. Cuando el oxígeno es reducido por ganancia de un electrón se produce el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), relativamente estable, precursor de la mayoría de las ROS y mediador de reacciones oxidantes. La dismutación del ión superóxido (espontánea o catalizada por las superóxido dismutasas) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que puede ser reducido a H_2O por las peroxidasas.

En presencia de un metal de transición, la reducción parcial del peróxido de hidrógeno genera el radical hidropéroxido ($\cdot OH$), uno de los oxidantes más potentes de la naturaleza. Cuando el hierro es el metal implicado en la reacción, el proceso se denomina reacción de Fenton y transcurre como se muestra en la Figura I.2.

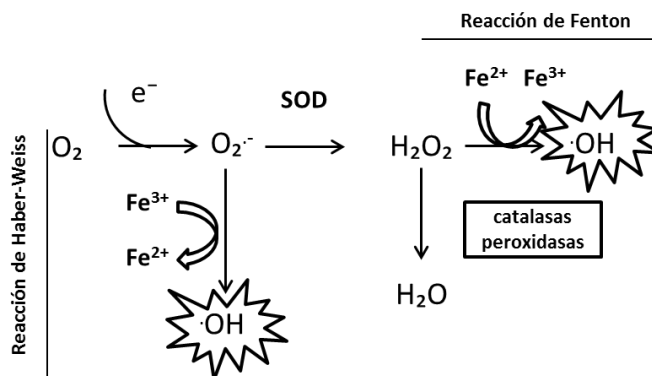


Figura I.2. Reacción de Haber-Weiss y reacción de Fenton. Respuesta bioquímica al estrés oxidativo.
 Figura adaptada de (Morano et al., 2012)

La mayor fuente intracelular de ROS es la fosforilación oxidativa a través de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria (Murphy, 2009). Para generar ATP, los electrones son transportados a través de los complejos proteicos que constituyen la cadena de transporte electrónico hasta el aceptor final, el oxígeno molecular, dando lugar a una molécula de agua. En eucariotas superiores, los complejos respiratorios I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y III (ubiquinol:citocromo c reductasa o complejo citocromo bc1) han sido identificadas como los principales sitios de generación de superóxidos de la mitocondria. Otros procesos metabólicos que pueden generar ROS endógeno en levaduras, dependiendo de las condiciones de crecimiento, son la degradación de ácidos grasos peroxisomales en la β -oxidación (Hiltunen et al., 2003) y la desaminación de aminoácidos durante el crecimiento con D-aminoácidos como fuente de carbono (Pollegioni et al., 2007).

El estudio de la respuesta a estrés oxidativo es importante ya que está implicado en numerosas patologías y enfermedades. Se ha descrito que una inhibición del complejo bc1 podría estar relacionado con la enfermedad de Parkinson (Testa et al., 2005). Además el estrés oxidativo está implicado en la muerte celular y enfermedades asociadas a la edad. Tanto las ROS como las especies reactivas del nitrógeno (RNS) pueden producir modificaciones en las proteínas. Las RNS deriva del óxido nítrico (NO) y son capaz de promover la modificación de grupos tiol por S-nitrosilación (Giustarini et al., 2004). Muchos estudios de estrés oxidativo utilizan el tratamiento con H_2O_2 como modelo de agente oxidante pero existen numerosas moléculas oxidantes que también desencadenan la respuesta a estrés oxidativo:

Hidroperóxidos: El H_2O_2 es una molécula ubicua formada como producto de la respiración aeróbica. Daña células promoviendo el estrés oxidativo pero también juega un papel importante como molécula señalizadora en muchos procesos biológicos (Bodvard et al., 2017). El H_2O_2 puede ser eliminado de la célula mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss (Figura 1.2), con formación de radicales hidroxilo (OH). Distintos hidroperóxidos orgánicos pueden ser usados para producir la oxidación lipídica, como por ejemplo, el cumeno o isopropilbenceno ($C_9 H_{12} O_2$), un hidroperóxido lipídico aromático soluble que es usado ampliamente como productor de ROS intracelulares (Thorpe et al., 2004).

Tertbutil hidroperóxido $(CH_3)_3 COOH$: es menos hidrofílico que el peróxido de hidrógeno y frecuentemente se usa como modelo de peróxidos de alquilo.

Anión superóxido: puede ser generado usando menadiona y paraquat y es la principal ROS producida en la cadena de transporte de electrones. No es muy reactivo pero actúa como precursor de otras ROS vía dismutación del H_2O_2 .

Compuestos tiólicos reactivos: debido a la importancia de la homeostasis redox durante condiciones de estrés oxidativo, los compuestos reactivos tiólicos son frecuentemente usados para inducir estrés oxidativo, como por ejemplo el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu que es un sustrato de las glutatión transferasas. La diamida es un oxidante específico de grupos tiol, capaz de atravesar membranas, que promueve la formación de puentes disulfuro (Kosower et al., 1969).

Estrés por metales pesados: los metales como el cobre y el hierro tienen una profunda influencia en la generación de ROS (Liochev and Fridovich, 1999).

2.1.2 Otros tipos de estrés

A continuación, se describen otros tipos de estrés que ocurren en el proceso tanto de fermentación alcohólica como en fase estacionaria. Como se ha comentado en el apartado 1 de esta Introducción, en el proceso fermentativo tanto el estrés por pH como por temperatura son muy importantes. La temperatura de crecimiento óptimo de la levadura es de 30 °C y en la fermentación pueden producirse variaciones de temperatura, de manera que se produce una disminución de la tasa de crecimiento y puede producir paradas en la fermentación (Salvadó et al., 2011). Estudiar los mecanismos por los cuales la levadura responde a la temperatura y su conexión con otros tipos de estrés (como el oxidativo) es importante para entender qué ocurre durante el proceso fermentativo.

Estrés por choque térmico: Cuando las células cambian a temperaturas más altas, se induce la síntesis de una familia de proteínas llamadas Proteínas de Choque Térmico, o *Heat Shock Proteins*, HSPs. Muchas de estas proteínas se expresan a temperaturas de crecimiento normal y juegan un papel esencial en el plegamiento y ensamblaje de proteínas. En la Figura I.3 se muestra un resumen de la respuesta por choque térmico en la levadura *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* hay al menos 56 HSPs diferentes y dos elementos de secuencia diferentes que regulan los genes de estas proteínas: el elemento STRE y el también mencionado Elemento de Choque Térmico, HSE. Los HSEs son secuencias de unión para el Factor de Choque Térmico, o *Heat Shock Factor*, HSF, y están compuestos por al menos 3 copias de una secuencia repetida nGAA_n. En *S. cerevisiae* el HSF está codificado por una única copia del gen esencial *HSF1*. El dominio del extremo amino terminal media la respuesta a altas temperaturas mientras que el dominio del extremo carboxilo terminal (CTA) es requerido para regular respuesta frente a altas temperaturas y frente al estrés oxidativo, por ejemplo, el extremo CTA es requerido para la expresión del gen *CUP1* que codifica la metalotioneína 1 responsable de la respuesta a estrés oxidativo y térmico. Se ha demostrado la necesidad de algunas HSPs en ausencia de estrés lo que explica que *HSF1* sea un gen esencial incluso en condiciones óptimas de crecimiento. Se ha observado que las HSPs (*HSP104*) producen termotolerancia y que uno de los mecanismos de termotolerancia es a través de la acumulación de trehalosa (Elliott et al., 1996). Además, se han descrito que algunas HSPs también tienen función como chaperonas (Morimoto, 2008; Verghese et al., 2012), tanto bajo condiciones normales de crecimiento como durante la respuesta a choque térmico.

Existen numerosas indicaciones de que la respuesta a choque térmico está relacionada también con otros tipos de estrés, como el oxidativo. La ausencia de las catalasas o las superóxidos dismutasas producen una hipersensibilidad al choque térmico (Davidson et al., 1996) y los niveles de glutatión reducido disminuyen durante el choque térmico en condiciones de aerobiosis pero no de anaerobiosis (Sugiyama et al., 2000) sugiriendo que el estrés por choque térmico induce un estrés oxidativo desencadenando la inducción de algunos genes antioxidantes, como los de la biosíntesis del glutatión (*GSH1* y *GSH2*) bajo condiciones aeróbicas.

Otro ejemplo de esta relación es el requerimiento de la superóxido dismutasa mitocondrial (Sod2p) para la tolerancia al estrés oxidativo inducido por choque térmico. Se ha demostrado que la coordinación de estas dos rutas de respuesta (respuesta a estrés oxidativo y térmico) son necesarias para hacer frente al compuesto celastrol que es un compuesto aislado de plantas usado por sus capacidades antiinflamatorias y anti-neurodegenerativas a través de la activación de Hsf1p. En *S. cerevisiae* se ha observado que este compuesto activa Hsf1p así como la respuesta a estrés oxidativo demostrando un papel antioxidante (Trott et al., 2008). Otros ejemplos de la conexión de la respuesta al estrés por choque térmico y por estrés oxidativo se demuestra en diversos artículos en lo que se ha estudiado la expresión de *HSP1* bajo condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂ (Ahn and Thiele, 2003; Lee et al., 2000; Liu and Thiele, 1996).

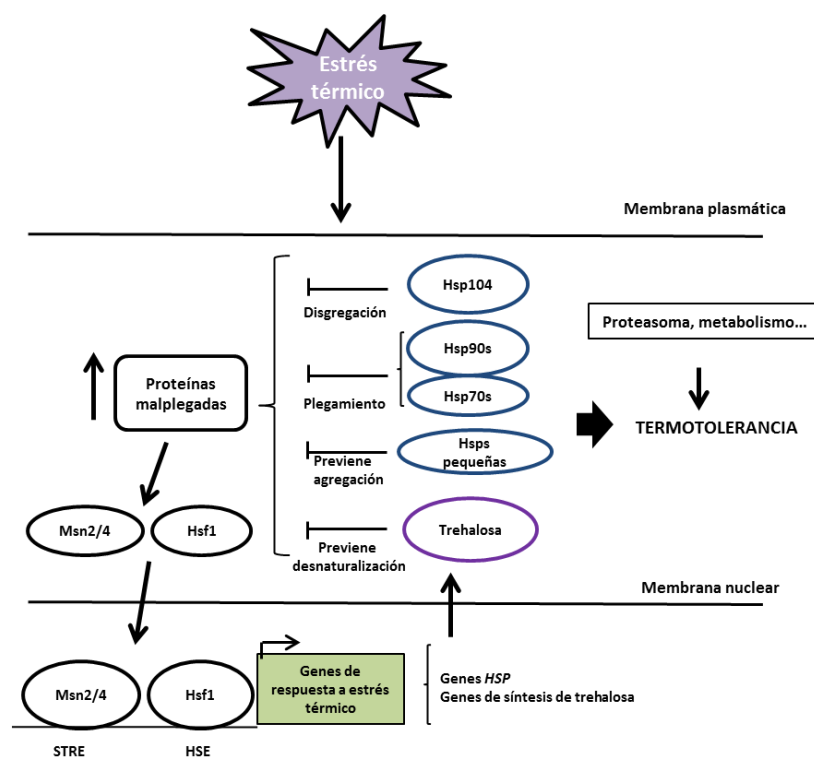


Figura I.3. Ruta de respuesta a estrés por choque térmico. Adaptado de (Verghese et al., 2012).

Durante la producción de levaduras o propagación de la biomasa, las células están sometidas a números cambios metabólicos y situaciones de estrés como ya se ha ido describiendo. Al inocular las células en la melaza se produce un estrés hiperosmótico debido a la alta concentración de azúcares y posteriormente, durante el crecimiento en melaza, la presencia de oxígeno y los cambios metabólicos determinan la aparición de un importante estrés oxidativo (Pérez-Torrado et al., 2005; Gómez-Pastor et al., 2012a).

Introducción

En el momento de finalización de la producción de biomasa en el que se elimina la agitación, la aireación y los nutrientes, hay un aumento del estrés por ayuno de nutrientes y las células entran en una fase estacionaria de no división. Le sigue, el proceso de deshidratación de la biomasa para producir levadura seca activa (LSA) y, como se ha comentado anteriormente, las condiciones clave son la temperatura y la velocidad de secado, que es un punto crítico para su estabilidad tecnológica. El déficit de agua aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno que contribuyen al daño celular actuando sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En la fermentación en mosto de uva, las células sufren un choque osmótico al inicio ya que el mosto de uva contiene unos 200g/L de monosacáridos. Con estos antecedentes es importante el estudio de la respuesta de las levaduras al estrés osmótico.

Estrés osmótico: La ruta que regula la respuesta al estrés osmótico es la ruta denominada HOG, por "High Osmolarity Glycerol Response". El control del contenido de agua es esencial para todos los tipos de células, de manera que cuando las células están expuestas a un choque hiperosmótico que provoca la pérdida de agua citoplasmática se activan diversos mecanismos para contrarrestar la deshidratación y proteger las estructuras celulares. La ruta HOG1 está implicada en la transducción de la señal generada por un incremento en la osmolaridad (Toone et al., 1998). Tal como se muestra en la Figura 1.4, la ruta HOG está constituida por un módulo MAPK que consiste en una cascada de quinasas que cuando son activadas, culminan en la fosforilación y activación de la proteína quinasa Hog1p. En esta cascada la treonina-serina MAPKK que fosforila a Hog1p es Pbs2p. El sensor de osmolaridad externo de la membrana es la proteína quinasa Sln1p, que conecta la membrana con el módulo MAPK usando un sistema de dos componentes (Ssk1p+Ypd1p) similar al de dos componentes en bacterias. Hay un segundo sensor de membrana, Sho1p, que transmite una señal a Pbs2p a través de la MAPKKK Ssk2p (Toone et al., 1998). La fosforilación de Hog1p por Pbs2p induce la acumulación en el núcleo de Hog1p (Ferrigno et al., 1998). Esta acumulación es transitoria y coincide con la inducción osmótica de una variedad de genes, por lo que Hog1p activa la expresión génica bajo condiciones de estrés osmótico. Se ha observado la implicación de los factores de transcripción Msn2/4p en la expresión de genes en respuesta a estrés osmótico a través de secuencias STRE presentes en sus promotores. Los genes inducidos por estrés osmótico se puede clasificar en varias categorías en función del proceso bioquímico que regulan (Posas et al., 2000). El metabolismo de carbohidratos está muy representado, incluyendo enzimas que son requeridas para la síntesis de glicerol y transportadores de azúcares así como genes que codifican enzimas para la producción de trehalosa y glucógeno. HOG controla la inducción por estrés osmótico de los genes que codifican para las enzimas de producción del glicerol, *GPD1* y *GPD2*. La acumulación de glicerol en respuesta a cambios hiperosmóticos incluye tanto la regulación de su producción como su eflujo. El glicerol es un producto de la reducción de dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3- fosfato que finalmente es desfosforilado a glicerol. La primera reacción es catalizada por las glicerol-3-fosfato deshidrogenasas dependientes de NAD^+ , codificadas por *GPD1* y *GPD2*, y la segunda por las glicerol-3-fosfato fosfatasas, codificadas por *GPP1* y *GPP2*. *GPD1* resulta inducido en condiciones de estrés osmótico mientras que *GPD2* incrementa su expresión en ausencia de oxígeno (Ansell et al., 1997). Respecto de las fosfatasas, solo *GPP2* es inducido bajo estrés osmótico.

Además de la biosíntesis, también la exportación de glicerol a través de la membrana plasmática, mediante la proteína Fps1p, participa en el control de la acumulación de glicerol en la célula, fundamental en condiciones de choque hiperosmótico.

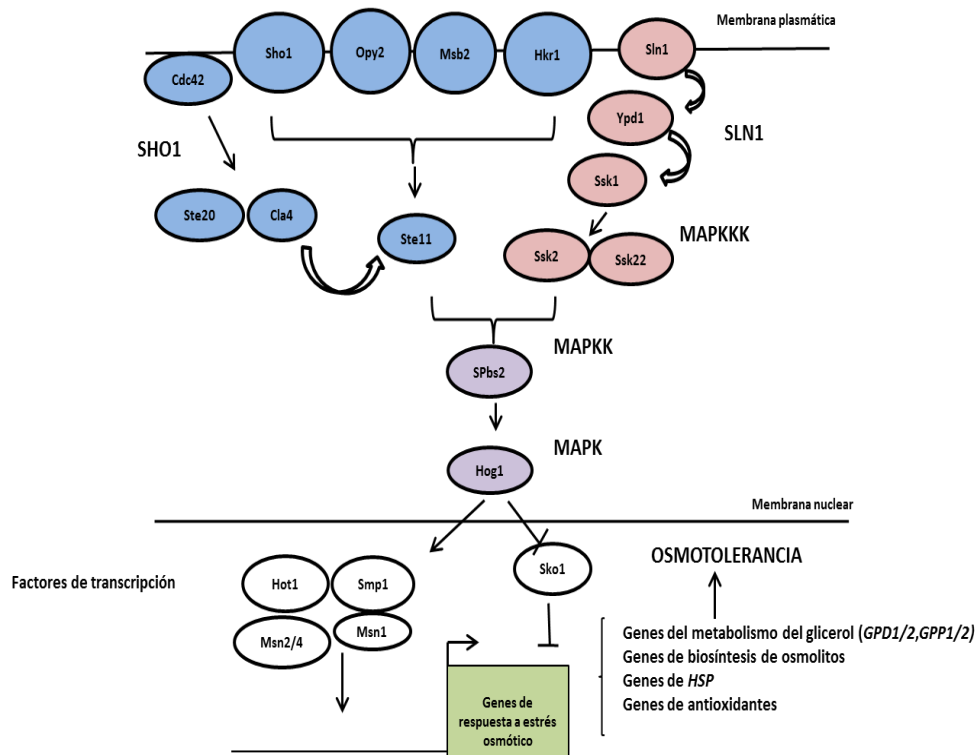


Figura I.4. Ruta de respuesta a estrés por choque osmótico. Adaptado de (Verghese et al., 2012)

Estrés por etanol: En la fermentación vínica, el estrés más característico de las etapas finales es el causado por la elevada concentración de etanol (11-14%). El etanol es altamente tóxico y afecta al metabolismo y crecimiento de las levaduras, así como otros compuestos producidos durante la fermentación de los azúcares, como son el ácido acético y el acetaldehído. La acumulación de acetaldehído y ácido acético por encima de ciertos límites no es deseable durante la fermentación vínica, mientras que la cantidad de etanol es uno de los parámetros fundamentales que definen el éxito de una fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2005). El equilibrio entre estos tres compuestos y las enzimas que lo producen es de especial importancia en enología.

En la Figura I.5 se resume los mecanismos de respuesta al etanol. La toxicidad del etanol incluye la inhibición de la captación de la glucosa y de aminoácidos, la reducción de la actividad de las enzimas glicolíticas y la disrupción de la integridad de la membrana. El etanol se intercala en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica resultando en una pérdida de la integridad de la membrana y un incremento de la permeabilidad (Charoenbhakdi et al., 2016; Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Introducción

Esto hace que aumente el influjo pasivo de iones, particularmente de protones a través de la membrana produciendo una acidificación citosólica.

La ATPasa vacuolar y la de la membrana plasmática tienen un papel muy importante, ya que son las encargadas de la regulación del flujo de protones tanto en el citosol como en la vacuola.

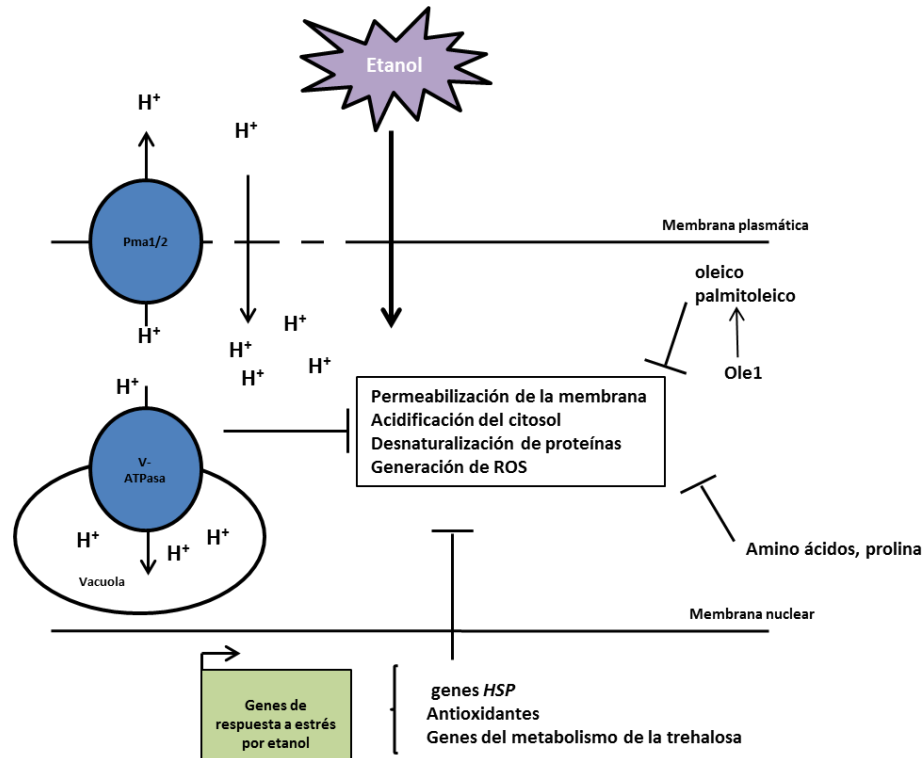


Figura I.5. Mecanismos de respuesta a estrés por etanol. Adaptado de (Verghese et al., 2012)

Bajo estrés por etanol se produce un aumento de la expresión de genes codificantes de la ATPasa vacuolar y de las bombas de protones de la membrana plasmática (*PMA1* y *PMA2*), que son requeridas para la tolerancia al etanol (Fernandes et al., 2003). En respuesta al efecto que produce el etanol en la membrana, se induce la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos insaturados (UFAs) y ergosterol para incrementar la integridad de la membrana y modificar o contrarrestar la fluidez. Entre los UFAs, los principales son el ácido oleico y el ácido palmitoleico que ve incrementada su síntesis a través de la desaturasa *Ole1p* en presencia de etanol (Heird and Lapillonne, 2005).

El etanol, también afecta a la estructura de las proteínas pudiendo desnaturalizarlas, por ello, se activa la expresión de genes de proteínas de choque térmico, HSP, así como genes de biosíntesis de la trehalosa (Alexandre et al., 2001). Otros estudios han demostrado que la acumulación de prolina confiere tolerancia al estrés por etanol, y se ha demostrado el papel de la prolina en la estabilización de proteínas y membranas, inhibiendo la agregación de proteínas durante el plegamiento.

2.2 Defensa antioxidante en *S. cerevisiae*

Hay una cierta controversia en la clasificación de los diferentes sistemas antioxidantes celulares, ya que éstos engloban numerosas moléculas y proteínas que participan en la protección mediante muy diversos mecanismos. Clasificar los sistemas antioxidantes en aquellos implicados en la detoxificación celular de las ROS y aquellos que previenen y/o reparan los daños celulares ocasionados por las ROS (Draculic et al., 2000; Herrero et al., 2008) permite ofrecer una visión general de la interconexión entre diferentes moléculas antioxidantes de bajo peso molecular, proteínas de protección celular y enzimas antioxidantes. En la Figura I.6 se muestra un cuadro resumen con los sistemas de detoxificación y los de protección en *S. cerevisiae*.

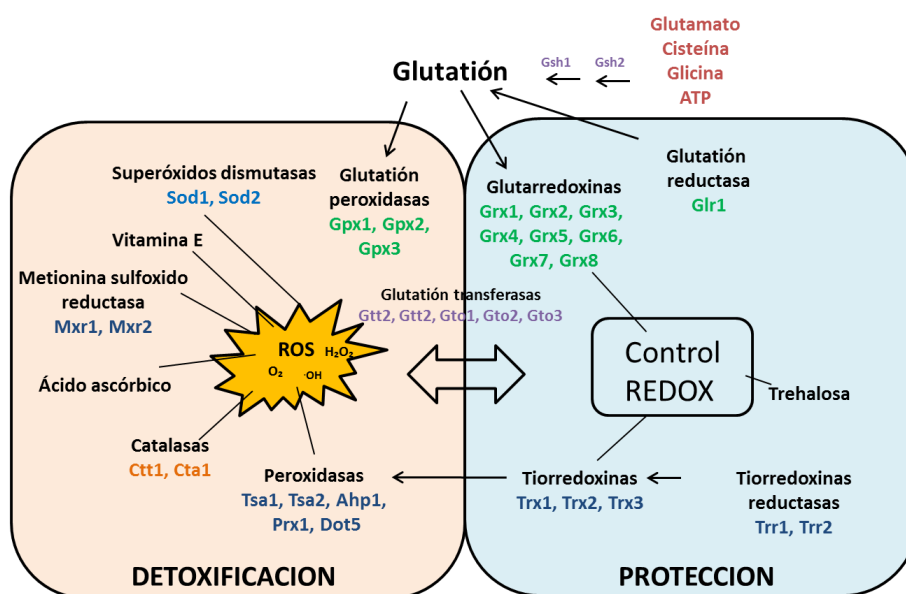


Figura I.6. Respuesta al estrés oxidativo. Sistemas de detoxificación y de protección en *S. cerevisiae*. Adaptado de (Herrero et al., 2008).

2.2.1 Sistemas de detoxificación celular de las ROS

Entre estos sistemas de detoxificación celular de las especies reactivas del oxígeno destacan enzimas y moléculas protectoras. La molécula más abundante y con mayor relevancia para la detoxificación no enzimática de ROS es el glutatión (Penninckx, 2002), aunque hay otras moléculas que también participan de manera minoritaria como la trehalosa y el ácido ascórbico.

Glutati3n:

El trip3ptido L- γ -glutamyl-L-cisteinilglicina, o glutati3n, es el tiol celular m3s abundante (con concentraciones en el rango nM) y tiene funciones directas e indirectas en muchos fen3menos biol3gicos importantes, como son la s3ntesis de prote3nas, la s3ntesis de DNA, la modulaci3n de la actividad enzim3tica, la protecci3n celular, el metabolismo de carcin3genos, de xenobi3ticos y de ROS (Schafer and Buettner, 2001). El glutati3n es un metabolito esencial en levaduras, requerido como reductor incluso en condiciones 3ptimas de crecimiento (Schafer and Buettner, 2001). El estr3s oxidativo convierte el glutati3n reducido (GSH) en su forma oxidada (GSSG). Sin embargo, la forma mayoritaria en las c3lulas es la reducida gracias a la acci3n constitutiva de la glutati3n reductasa, Glr1p. *GLR1* codifica para una oxidorreductasa dependiente de NADPH que convierte el GSSG a GSH usando el poder reductor en forma de NADPH generado en la ruta de las pentosas fosfato.

EL glutati3n es sintetizado mediante dos pasos dependientes de ATP. La γ -glutamylciste3na sintetasa (Gsh1p) cataliza el primer paso, donde se forma el dip3ptido γ -Glu-Cis a partir de glutamato y ciste3na (Meister and Anderson, 1983). El segundo paso es catalizado por la glutati3n sintetasa (Gsh2p), que une la glicina al dip3ptido γ -Glu-Cis, dando lugar al trip3ptido glutati3n (Grant et al., 1997). La bios3ntesis del glutati3n est3 estrechamente controlada a trav3s de dos mecanismos de regulaci3n de la enzima Gsh1p, feedback negativo mediado por el glutati3n (Meister and Anderson, 1983) y expresi3n del gen *GSH1* controlada por los factores transcripcionales que tambi3n regulan la bios3ntesis de amino3cidos con grupos sulfuro (Wheeler et al., 2003). El glutati3n es importante durante condiciones de estr3s como cofactor de las enzimas de defensa a estr3s, entre las que se incluyen las glutati3n transferasas (GSTs) y las glutati3n peroxidasas (GPXs). El mutante en el gen *GSH1* tiene un defecto en la conjugaci3n de xenobi3ticos, en la s3ntesis de DNA y de prote3nas demostrando as3, la importancia del glutati3n en la c3lula.

La eliminaci3n del glutati3n causa una parada en la fase G1 del ciclo celular y su funci3n est3 relacionada con la regulaci3n de la ribonucle3tido reductasa, que podr3a explicar el defecto en el mutante de las tioredoxinas citos3licas (ver m3s adelante) en la fase S del ciclo celular (Xiong et al., 2011). Tambi3n se ha demostrado el papel del glutati3n en el transporte electr3nico mitocondrial, en procesos de ubiquitina/proteasoma, en regulaci3n transcripcional, en transporte i3nico as3 como en el mantenimiento de la integridad celular (Perrone et al., 2005).

Uno de los papeles m3s importantes que realiza el glutati3n en la c3lula es la protecci3n de las prote3nas frente a estr3s oxidativo. Bajo condiciones de estr3s oxidativo, los tioles de las ciste3nas son las dianas m3s susceptibles de oxidaci3n y pueden sufrir varias alteraciones redox, reversibles y/o irreversibles, en respuesta a este estr3s. Todas las modificaciones en los tioles de las prote3nas pueden producir cambios en su actividad. Actualmente, tiene especial inter3s la oxidaci3n de los grupos sulfidrilo de las ciste3nas ya que 3stas est3n presentes en el sitio activo de muchas prote3nas de funciones diversas (tr3fico, se3nalizaci3n celular, rutas metab3licas, expresi3n g3nica, etc.) (Biswas et al., 2006; Jacob et al., 2006). En las alteraciones de los grupos tiol de las ciste3nas de las prote3nas est3n implicados el GSH y los sistemas tioredoxina y glutarredoxina.

La exposición de las cisteínas en la superficie de la proteína es una función necesaria para prevenir cambios redox. Normalmente estas cisteínas se encuentran reducidas y sirven como sensores redox celulares. Los cambios en el estado redox celular así como incremento de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno pueden inducir la formación de puentes disulfuro mixtos entre el grupo sulfidrilo de la proteína y el glutatión, en un proceso reversible que se denomina S-glutationilación. Este mecanismo postraducciona no sólo ocurre en presencia de estrés oxidativo o reductivo, existiendo un nivel basal y regulado de glutatiónilación. El anión tiolato de los residuos de cisteína susceptibles a modificaciones redox puede ser reversiblemente oxidado a ácido sulfénico, o irreversiblemente oxidado a sulfínico o sulfónico lo cual produce la inactivación de la proteína. Se ha observado que la sulfurredoxina codificada por el gen *SRX1* es capaz de reducir el ácido sulfínico en las peroxirredoxinas (Biteau et al., 2003). Debido a que las cisteínas libres y el GSH son las moléculas tiólicas de bajo peso molecular más abundantes en la célula, las modificaciones S-glutationilación y S-cistenilación son muy importantes para la regulación redox celular.

La S-glutationilación de las proteínas puede surgir por diferentes razones:

- Interacción directa entre los sulfidrilos de las proteínas parcialmente oxidadas
- Reacción de intercambio tiol/disulfuro entre los tioles de las proteínas y el GSH.
- Reacción entre tioles de las proteínas e intermediarios S-nitrositiol y S-nitrosoglutationilación (GSNO)
- Directamente entre un residuo libre de cisteína y el glutatión.

A pesar de que el enlace entre el glutatión y la proteína es reversible bajo condiciones reductoras, en condiciones oxidativas la S-glutationilación se puede mantener indefinidamente (Beer et al., 2004; Gilbert, 1995). En muchas situaciones la S-glutationilación es transitoria por lo que hay dos tipos de glutatiónilación, transitoria y aquella glutatiónilación permanente.

La glutatiónilación es una modificación postraducciona reversible. El pequeño porcentaje del total celular de glutatión (GSH+GSSG+GSSP) que está presente de forma constitutiva como PSSG en condiciones basales, puede incrementar entre el 20 y el 50% en condiciones de estrés, lo que se correlaciona con la disminución de los niveles de glutatión libre en la célula (Gilbert, 1995). Además, la S-glutationilación sirve como almacenaje del GSH dentro de la célula ya que, una vez el GSH se ha oxidado (GSSG) es rápidamente extruido de la célula (Reynolds, 1979). Sin embargo, el papel fundamental de la S-glutationilación es la protección de las proteínas de la modificación irreversible por oxidación. Bajo condiciones de estrés oxidativo un grupo tiol de una cisteína de una proteína es glutatiónilado, impidiendo la unión del oxígeno a este radical y por tanto, impidiendo la oxidación irreversible y la inactivación de la proteína. La S-glutationilación puede regular la respuesta antioxidante ya que tanto la superóxido dismutasa 1 (Sod1p), como tiorredoxinas, glutarredoxinas y Prx1p son susceptibles a S-glutationilación en eucariotas superiores (Manevich et al., 2004; Starke et al., 2003; Tao and English, 2004) así como el control de muchas proteínas implicadas en el metabolismo como con proteínas de enfermedades relacionadas con la edad (Brasil et al., 2013; Mannarino, 2011; Martins and English, 2014; McDonagh et al., 2005, 2011a, 2013).

Introducción

La reversibilidad de la S-glutathionilación es un requisito para la señalización celular. La deglutathionilación consiste en la eliminación del glutatión del residuo tiólico de la cisteína. Esta eliminación, tras el estrés oxidativo, permite que se recupere la actividad de la proteína y no se vea afectada por una oxidación irreversible. Se han descrito una serie de proteínas y factores implicados tanto en glutathionilación como en deglutathionilación que se recogen en la figura I.7 (Dalle-Donne et al., 2007; Greetham et al., 2010; Mieyal and Chock, 2012), destacando la importancia de tiorredoxinas y glutarredoxinas como las principales enzimas implicadas en deglutathionilación.

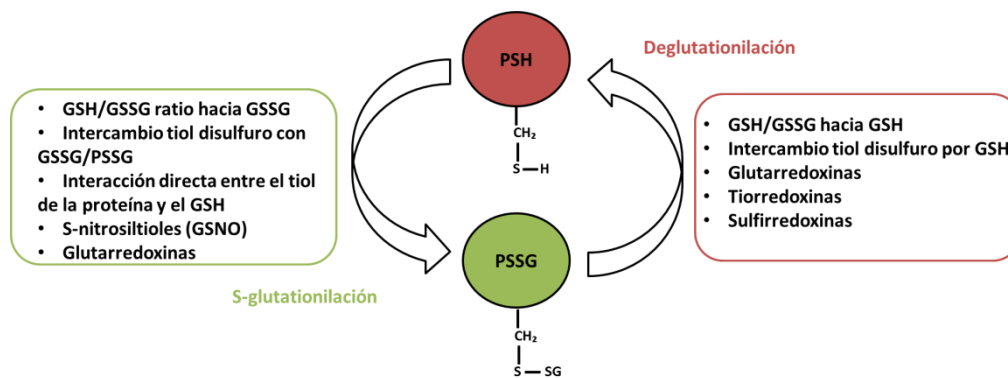


Figura I.7. Sistema de glutathionilación de proteínas en *S. cerevisiae*. Enzimas y moléculas implicadas. Adaptado de (Dalle-Donne et al., 2007).

Superóxido dismutasas (SOD):

Las superóxido dismutasas son enzimas que convierten el anión superóxido en peróxido de hidrógeno que puede ser, a su vez, reducido a H_2O por las catalasas o peroxidasas. Son actividades antioxidantes ubicuas que se clasifican en función de su requerimiento iones metálicos. Hay dos tipos de SODs: la Cu-Zn -SOD, o Sod1p, que es citoplasmática y la Mn-SOD, o Sod2p, que es mitocondrial; además de la diferente localización subcelular y el diferente requerimiento de cofactores, tienen diferentes papeles durante condiciones de estrés oxidativo (Culotta et al., 2006).

La maduración de Sod1p y su compartimentación requiere la acción de la chaperona Ccs1p. Además se requiere un enlace disulfuro entre dos cisteínas de Sod1p (C57 y C176) para evitar la agregación de la proteína y, por tanto, la pérdida de actividad. Se ha descrito que la agregación y pérdida de actividad del homólogo de Sod1p en humanos podría ser la causa del daño en las neuronas de personas con esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Higgins et al., 2003; Roberts et al., 2007). Sod2p es particularmente requerida durante la fase estacionaria, lo que se podría relacionar con la generación de radicales superóxido a partir de la respiración mitocondrial (Longo et al., 1996).

Catalasas:

S. cerevisiae tiene dos catalasas, Cta1p localizada en los peroxisomas y Ctt1p que es citosólica. Ambas actividades enzimáticas reducen peróxido de hidrógeno. Cta1p está relacionada con la detoxificación del peróxido de hidrógeno generado por la β -oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas (Hiltunen et al., 2003). A pesar de que la expresión de *CTA1* está inducida en células de levadura crecidas con ácidos grasos como única fuente de carbono (Filipits et al., 1993), un mutante en *CTA1* puede crecer en estas condiciones por lo que la actividad catalasa peroxisomal es dispensable. La expresión de *CTT1* está inducida por varias condiciones de estrés, incluyendo choque térmico, osmótico, ayuno y peróxido de hidrógeno (Martinez-Pastor et al., 1996).

Peroxidasas:

Las peroxidasas reducen peróxidos inorgánicos y orgánicos en los correspondientes alcoholes usando la cisteína de su sitio activo. La actividad peroxidasa requiere un donador de electrones, lo que permite clasificarlas en dos clases, las glutatión peroxidasas (GPXs), que utilizan el glutatión como reductor, y las tiorredoxina peroxidasas, también llamadas peroxirredoxinas, que utilizan a las tiorredoxinas como reductoras. Existen dos tipos de GPXs (Wheeler et al., 2003), las clásicas GPXs son multiméricas, solubles y actúan como hidroperóxidos inorgánicos/orgánicos y por otro lado, las que reducen hidroperóxido fosfolípidos (PHGPXs) que normalmente son monoméricas y asociadas a membrana, permitiendo su mantenimiento en condiciones de estrés oxidativo (Sies, 1986).

A lo largo de la tesis tienen especial importancia las peroxirredoxinas que reducen peróxidos y peroxinitrilos utilizando a las tiorredoxinas como donadores de electrones y tienen múltiples papeles en la protección frente a estrés, actuando como antioxidantes, chaperonas moleculares y en la regulación de la transducción de la señal (Wood et al., 2003). Se dividen en dos clases, 1-cys y 2-cys en base al número de residuos de cisteína que estén directamente implicados en la catálisis. Durante la catálisis, el residuo cisteínico peroxidático de una subunidad es oxidado a ácido sulfénico (-OH), se une a la cisteína resolutive de otra subunidad para formar un enlace disulfuro que es reducido por tiorredoxinas. En levaduras se han escrito tres peroxirredoxinas citoplasmáticas de tipo 2-cys: Tsa1p, Tsa2p y Ahp1p (revisión de Herrero et al., 2008), con similar actividad pero implicadas en distintas funciones. También se conoce una peroxirredoxina nuclear, Dot5p, que también es de tipo 2-cys y, finalmente una mitocondrial, Prx1p, que es la única monotiólica (1-cys).

Tsa1p es la peroxirredoxina más abundante y con una mayor actividad, además actúa como chaperona que promueve la resistencia a estrés (Jang et al., 2004; Weids and Grant, 2014). Tiene una alta homología con Tsa2p, que posee actividades peroxidasa y chaperona similares, pero se expresa muchísimo menos (Jang et al., 2004). Ambas tienen actividad peroxinitrito reductasa, lo que se relaciona con su papel en la defensa frente a estrés nitrosativo. Durante un crecimiento normal, Tsa1p está presente como una mezcla de formas oligoméricas y pequeñas que poseen dos actividades, peroxidasa y chaperona.

Introducción

En respuesta a estrés por peróxidos, cambia de esa forma a otra de mayor peso molecular, denominada superchaperona. La función peroxidasa predomina en la forma de Tsa1p de bajo peso molecular mientras que la forma de mayor peso molecular, chaperona, predomina cuando hay un estrés oxidativo constante. Se ha observado, que Tsa1p puede suprimir, *in vitro*, la agregación de proteínas mal plegadas, uniéndose a ellas. Los niveles de agregación se incrementan en respuesta al estrés oxidativo por H_2O_2 y reductor por DTT. Esta agregación de los ribosomas se correlaciona con una inhibición de la traducción, sugiriendo que mediante esta inhibición Tsa1p produce protección celular y siendo, por tanto, la primera peroxirredoxina implicada en la maquinaria traduccional (Trotter et al., 2008). El estado redox de Tsa1p es mantenido por el sistema tioredoxina (TRX) citoplasmático (Trx1p, Trx2p y Trr1p), sistema que es requerido para el cambio de la forma de bajo peso molecular, con función principalmente peroxidasa, a la forma de alto peso molecular, con función predominante de chaperona, como se representa en la Figura I.8.

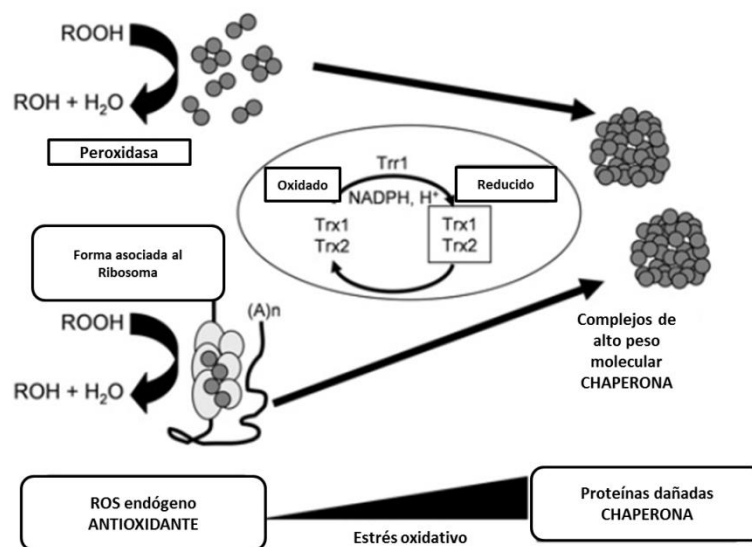


Figura I.8 Papel de la peroxirredoxina reductasa Tsa1p en la protección frente al estrés oxidativo.
Adaptado de (Trotter et al., 2008)

Como ya se ha comentado, las peroxirredoxinas 2-cys, tienen dos cisteínas necesarias para su ciclo catalítico. Emplean el átomo de azufre (S) de una cisteína conservada evolutivamente, llamada cisteína peroxidática (CysP) para la ruptura de la unión peroxilo con la consiguiente formación de un grupo sulfénico:



La cisteína resolutive, CysR, permite resolver el estado de la peroxirredoxina conservando la cisteína activa con su función catalítica. Para ello forma transitoriamente sulfonato en el centro activo y finalmente un puente disulfuro entre las dos cisteínas liberando H₂O:



En Tsa1p, la cisteína peroxidática ocupa la posición 48 en la secuencia aminoacídica (C48) y la resolutive, la posición 171, C171. Se ha descrito el papel de ambas cisteínas en la regulación de la agregación y protección de proteínas ribosomales. Recientemente, se ha observado el papel de Tsa1p en la respuesta a estrés y su conexión con la restricción calórica, la ruta PKA y la protein quinasa Gcn2p en la longevidad replicativa (Molin et al., 2011; Nyström et al. 2012, Andersson et al., 2013; Molin and Demir, 2014).

Dot5p es la peroxirredoxina 2-cys nuclear en levaduras, más activa frente los hidroperóxidos de alquilo (Doi et al., 2003). Se ha observado que, más que actuar como antioxidante, funciona regulando el silenciamiento telomérico (Izawa et al., 2004).

La última de esta familia de peroxidases de levadura es Prx1p, de localización mitocondrial, y la única de tipo 1-cys (Pedrajas et al., 2000), pues posee un residuo de Cys con actividad peroxidática pero no el que aporta en las otras peroxirredoxinas la actividad resolutive. La cisteína peroxidática de Prx1p es oxidada a ácido sulfénico por hidroperóxidos (Greetham and Grant, 2009). El glutatión es capaz de unirse eficientemente al ácido sulfénico dando lugar a una Prx1p glutationilada, protegida así de la oxidación irreversible. Al no poseer cisteína resolutive, Prx1p, se regenera a través de la actuación de la tiorredoxina reductasa mitocondrial, Trr2p, o alternativamente de la glutarredoxina Grx2p (Pedrajas et al., 2010), indicando que existe un solapamiento entre ambos sistemas de reparación antioxidante de proteínas.

2.2.2 Componentes de protección y/o reparación

Como ya se ha comentado, los residuos de aminoácidos azufrados son las principales dianas de modificación por oxidación en las proteínas, daño para el que se han descrito dos mecanismos enzimáticos distintos que permiten su reparación: los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina (Holmgren, 1989), que actúan en compartimentos subcelulares diferentes (Figura I.9).

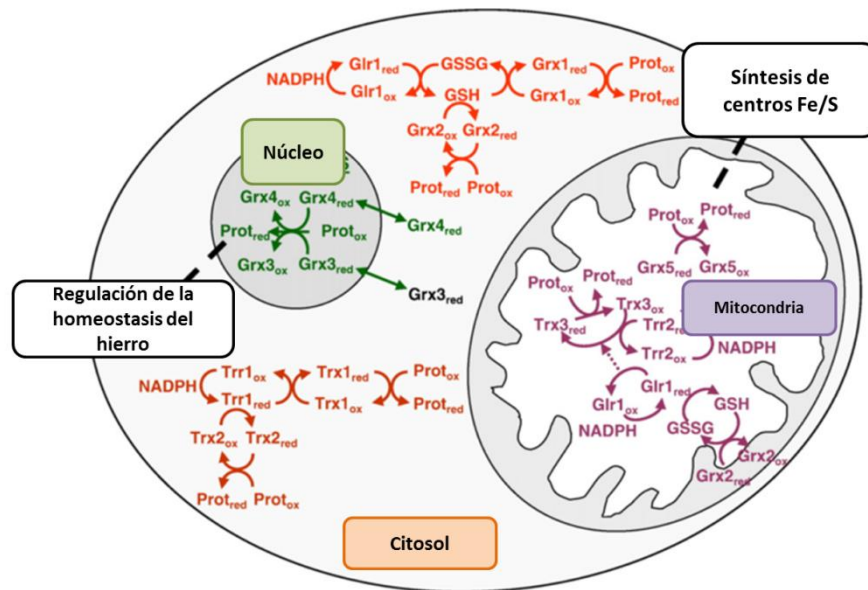


Figura I.9 Localización celular del sistema tiorredoxina y glutarredoxina en *S. cerevisiae*. Adaptado de (Herrero et al., 2008)

2.2.2.1 Sistema tiorredoxina

Las tiorredoxinas son pequeñas oxidorreductasas que contienen, en su sitio activo, dos residuos de cisteína conservados implicados en la reducción de grupos tiol. El sistema tiorredoxina (TRX) citoplasmático se compone de dos tiorredoxinas, Trx1p y Trx2p, y una tiorredoxina reductasa, Trr1p (Gan, 1991). Una cepa de levadura mutante en ambas tiorredoxinas es auxótrofa para aminoácidos azufrados ya que las tiorredoxinas citoplasmáticas son las donadoras (a través de Trr1p) del hidrógeno a la enzima PAPS reductasa que convierte 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) en sulfito. Estudios recientes han demostrado que esta auxotrofia para la metionina es dependiente de metabolismo aeróbico (Draculic et al., 2000). La delección de estas dos tiorredoxinas también afecta al ciclo celular provocando una fase S más prolongada (Muller, 1991) debido a que las tiorredoxinas también son las encargadas de reducir a la ribonucleótido reductasa (RNR) durante dicha fase del ciclo (Koc and Merrill, 2007).

La mayor parte de la función antioxidante de las tiorredoxinas es mediada por las peroxirredoxinas, regulando el ciclo de oxidación/reducción gracias al poder reductor de Trr1p. El sistema tiorredoxina citosólico también es importante para la defensa frente a hidroperóxidos añadidos externamente, aunque se ha visto que Trx2p tiene un papel más importante que Trx1p en esta función, lo que indica que no hay un solapamiento total de las funciones de ambas tiorredoxinas. El papel del sistema tiorredoxina frente a condiciones reductoras opera a través de la actividad chaperona de Tsa1p, sugiriendo que podría prevenir la agregación de proteínas ribosomales mal plegadas producidas en condiciones de estrés reductor (Rand and Grant, 2006a).

La tioredoxina reductasa Trr1p es una flavoproteína que reduce el NADPH a NADP⁺, donando el H⁺ a las tioredoxinas para reducir las y que vuelvan a recuperar su actividad. Se ha observado diferencias entre el doble mutante de las tioredoxinas citosólicas comparado con el mutante de la tioredoxina reductasa 1 en respuesta a diferentes situaciones que se irán discutiendo a lo largo de esta tesis, concluyendo que la tioredoxina reductasa 1 podría tener otras funciones o sustratos hasta ahora desconocidos. Las levaduras también poseen un sistema tioredoxina (TRX) mitocondrial, constituido por una tioredoxina, Trx3p, y una tioredoxina reductasa, Trr2p (Pedrajas et al., 1999). El sistema TRX mitocondrial está implicado en la protección frente al estrés oxidativo generado durante el metabolismo respiratorio y no frente a agentes oxidantes exógenos. Además, se ha demostrado que la Trr2p tiene funciones independientes de Trx3p (Pedrajas et al., 2000; Trotter and Grant, 2005).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado la importancia del sistema tioredoxina citoplasmático en la protección y respuesta frente el estrés oxidativo durante procesos industriales como la propagación de biomasa y la fermentación vínica, al mostrar que el daño oxidativo por carbonilación sobre la proteína de la vía fermentativa Adh1p está implicado en la pérdida de capacidad fermentativa de la levadura en condiciones industriales y que este daño es paliado por la sobreexpresión de *TRX2* (Gómez-Pastor et al., 2012a, 2012b).

2.2.2.2 Sistema glutaredoxina

Las glutaredoxinas son proteínas pequeñas que actúan como tiol oxidorreductasas responsables de la reducción de enlaces disulfuro de proteínas o entre proteína y glutatión. Esta reacción también implica los residuos de cisteína del sitio activo del enzima, con TRX o GSH como donadores de hidrógeno (Fernandes et al., 2003; Holmgren, 1989; Toledano et al., 2007). Las glutaredoxinas celulares clásicas contienen un ditiol conservado en el sitio activo (Cys-Pro-Tyr-Cys) y forma parte del sistema glutaredoxina, en el cual la glutatión reductasa transfiere electrones desde el NADPH a las glutaredoxinas vía glutatión. La acción de estas enzimas se ha descrito como implicada en diferentes funciones celulares: plegamiento de proteínas y regulación, reducción de hidroxiascorbato, protección frente a ROS y metabolismo del azufre.

Las levaduras tienen dos glutaredoxina ditiólicas Grx1p y Grx2p (Luikenhuis et al., 1998) presentes en el citoplasma, aunque una parte de Grx2p se encuentra en la mitocondria (Porrás et al., 2006). Grx1p confiere protección frente a anión superóxido y frente a hidroperóxido mientras que Grx2p está especializado en la protección frente a hidroperóxidos de manera que sus funciones son sólo parcialmente solapantes y se han descrito distintos papeles tanto en condiciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés (Grant et al., 2000). Sus genes codificantes, *GRX1* y *GRX2*, están regulados en respuesta al estrés oxidativo a través de elementos *STRE*, aunque la inducción del segundo es mucho más rápida que la del primero. Grx1p y Grx2p activan *in vitro* a las glutatión transferasas, que conjugan el glutatión a compuestos electrofílicos endógenos y exógenos, incluyendo xenobióticos, drogas, metales pesados y productos del estrés oxidativo, resultando en una excreción y detoxificación de las moléculas conjugadas (Hayes et al., 2005).

S. cerevisiae tiene dos glutatión transferasas estándar, Gtt1p y Gtt2p. Grx1/2p cooperan con éstas en la protección frente a hidroperóxidos y compuestos xenobióticos.

Hay hasta ocho glutatión peroxidadas que están en diferentes compartimentos celulares. Grx3p y Grx4p están localizadas en el núcleo (Molina et al., 2004) y tienen función de reguladoras de la localización nuclear del factor de transcripción Atf1p (Pujol-Carrion et al., 2006), de manera que la delección de *GRX3* y *GRX4* causa una localización nuclear constitutiva del factor Atf1p. Grx5p se encuentra en la matriz mitocondrial, donde participa en la biosíntesis de los *clusters* Fe/S (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002). Grx6p se encuentra en el retículo endoplasmático y Grx7p en el Aparato de Golgi. Son todas ellas monotiólicas y regulan las rutas secretoras en respuesta al estrés. Grx8p es una glutarredoxina ditiólica para la que no se ha descrito función en la respuesta al estrés oxidativo (Eckers et al., 2009).

Sulfirredoxina, Srx1p, reduce el ácido sulfínico (-SO₂) de los residuos de cisteína oxidados de ciertas peroxirredoxinas en una reacción que requiere Mg, ATP y la participación de un residuo de cisteína localizado en el centro activo de la peroxirredoxina (Tsa1p) (Biteau et al., 2003). Se ha demostrado que los niveles de mRNA del gen *SRX1* están regulados a nivel de traducción por la protein quinasa Gcn2p en condiciones de restricción dietaria y bajo estrés oxidativo por H₂O₂ (Molin et al., 2011).

Metionina sulfóxido reductasa: Los residuos de metionina de las proteínas son especialmente susceptibles a la oxidación por las ROS. Esta oxidación puede ser reversible, gracias a la acción de las metionina sulfóxido reductasas Mxr1p y Mxr2p (Moskovitz and Oien, 2010), en una reacción catalizada por las tiorredoxinas citosólicas.

Por último, la ruta de las pentosas fosfato, ya que tanto la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf1p), como la transcetolasa (Tlk1p) y la ribulosa -5-fosfato epimerasa (Rpe1p) son enzimas cruciales para la generación de poder reductor intracelular en forma de NADPH, poder reductor que es absolutamente necesario para la función, en la protección antioxidante, de glutarredoxinas, tiorredoxinas y glutatión (Holmgren, 1989).

2.3 Regulación transcripcional de la respuesta a estrés oxidativo

Bajo condiciones de estrés por peróxido de hidrógeno las levaduras activan los sistemas dependientes de TRX y de glutatión, así como la ruta de las pentosas fosfato (Godon et al., 1998). A nivel transcripcional son dos factores específicos los que están implicados, Yap1p y Skn7p, además de los factores generales Msn2/4p (figura I.10).

Yap1p y Skn7p participan cooperativamente en la respuesta. Skn7p es requerida para la activación de un grupo de proteínas participantes en el sistema TRX, pero no en los mecanismos de defensa dependientes de glutatión ni por la ruta de las pentosas fosfato, mientras que Yap1p es requerido en todos los casos. La proteína Skn7p tiene un dominio de unión al DNA con homología al factor de choque térmico Hsf1p y se ha observado una acción cooperativa entre ambas respuestas de estrés después del choque térmico (Raitt et al., 2000).

Skn7p está implicado en el control de la síntesis de la pared celular, en ciclo celular y en la respuesta a estrés hipoosmótico. Otras proteínas que regulan conjuntamente estos factores de transcripción son las superóxidos dismutasas Sod1p y Sod2p y las peroxidasas Tsa1p y Ahp1p.

Yap1p es un factor de transcripción de respuesta al estrés oxidativo con estructura de tipo cremallera de leucina, segundo miembro de la familia bZip después de Gcn4p, cuya sobreexpresión confiere resistencia a múltiples drogas (Leppert et al., 1990). En células no estresadas, Yap1p está localizado en el citoplasma mediante el transporte desde el núcleo llevado a cabo por la exportina Crm1p (Kuge et al., 2001; Yan et al., 1998). Tanto la diamida como los hidroperóxidos inhiben la salida de Yap1p del núcleo a través de su interacción con Crm1p produciendo su acumulación. Yap1p contiene dos cisteínas susceptibles de oxidación, siendo su estado redox crucial para su regulación bajo estrés oxidativo (Gulshan et al., 2005). Yap1p puede ser activada por dos mecanismos: mediante ROS (hidroperóxidos y anión superóxido) y mediante reactivos químicos tóxicos (electrófilos y metales pesados en forma catiónica divalente). En respuesta a la activación por ROS, Yap1p está sujeto a cambios conformacionales causados por un modificación de su estado redox al formarse enlace disulfuro intramolecular entre la cisteína 303 y la cisteína 598. Como consecuencia de este cambio estructural la interacción entre Yap1p-Crm1p es evitada, lo que conduce a la acumulación de Yap1p en el núcleo y a la activación de su función como factor transcripcional (Delaunay et al., 2002). Se ha descrito también una posible interacción entre las cisteínas 310 y 629 de Yap1p. La oxidación de Yap1p no es directa sino que la glutatión peroxidasa Gpx3p actúa como sensor del nivel de H_2O_2 y forma un intermediario disulfuro a través de su cisteína 36 y la cisteína 598 de Yap1p. Sin embargo, el mecanismo de respuesta de Yap1p a la diamida, a electrófilos y a metales pesados divalentes es independiente de Gpx3p.



Figura I.10 Regulación de la respuesta a estrés oxidativo. Adaptado de (Temple et al., 2005)

Daños celulares provocados por el estrés oxidativo:

A pesar de los mecanismos de respuesta a estrés, la exposición severa a ROS y su acumulación provocan daños en el DNA, RNA, proteínas y lípidos de membrana. Los **daños provocados en el DNA** están mediados principalmente por la acción del radical hidroxilo (OH[·]) así como por los radicales derivados de la peroxidación de lípidos y proteínas. Este daño en el DNA puede ser por roturas de doble cadena, por modificaciones directas de las bases nitrogenadas, por formación de huecos y entrecruzamiento, así como por modificaciones a nivel del esqueleto carbonado de la hélice que eliminan los átomos de hidrógeno, desestabilizando la estructura de la molécula (Cadet et al., 2003).

A nivel de lípidos, el radical hidroxilo, OH[·], provoca una reacción de peroxidación de que comienza con la oxidación de las cadenas de lípidos insaturados formando un primer radical lipídico. En presencia de O₂, los radicales lipídicos se convierten en radicales peróxido (LOO[·]) y alcoholoxilo (LO[·]) que son los que producen la peroxidación lipídica y la desestabilización de las membranas celulares (B and JM, 1986). Durante la peroxidación lipídica se generan, además, otros compuestos que pueden reaccionar con proteínas y con las bases nitrogenadas del DNA, extendiendo así la gravedad del daño celular.

En cuanto al daño oxidativo a **nivel de proteínas**, como se ha mencionado anteriormente, es el daño celular más común por la acumulación de ROS o por los subproductos generados a partir de otros daños celulares, como la peroxidación de lípidos, y se manifiesta principalmente en la carbonilación de ciertos residuos. La célula presenta mecanismos de protección, como la S-glutacionilación la cual tiene un papel importante en esta tesis y ya se ha explicado anteriormente.

3. LONGEVIDAD EN LEVADURAS

La levadura *S. cerevisiae* es considerada, desde hace mucho tiempo, una célula eucariota prototipo, ideal para el estudio y el descubrimiento de los fenómenos básicos que regulan la vida. En comparación con otros sistemas, la facilidad y la rapidez con la que se puede estudiar el envejecimiento en levaduras ha permitido definir los mecanismos moleculares implicados así como, la identificación de docenas de factores que modifican esta longevidad. El envejecimiento biológico, o senescencia, se puede definir como la degradación de las funciones biológicas con el paso del tiempo que termina provocando la muerte de la célula o del individuo. El estudio de los procesos de envejecimiento y longevidad en levaduras ha permitido identificar y analizar factores y rutas que lo regulan, así como descubrir ciertas drogas anti-edad y comprobar que muchas de las rutas implicadas están conservadas desde levaduras hasta mamíferos (Kaeberlein, 2010). En la regulación de la longevidad en levaduras intervienen diferentes mecanismos que se detallarán a continuación.

3.1 Tipos de longevidad

El envejecimiento como se ha comentado anteriormente, es el conjunto de modificaciones tanto morfológicas como fisiológicas irreversibles que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo. En *S. cerevisiae* existen dos modelos de envejecimiento, longevidad replicativa (LR) y longevidad cronológica (LC) (Figura I.11).

La **longevidad replicativa (LR)** es el modelo de envejecimiento de las células mitóticamente activas en las cuales la longevidad de la célula madre es definida por el número de células hijas producidas antes de la senescencia. Cada célula individual de levadura puede producir un número limitado de células hijas a lo largo de toda su vida, entre 20 y 30 generaciones (Mortimer and Johnston, 1959). Este proceso puede durar entre 2 y 3 días en un medio completo a 28°C, siendo uno de los procesos de envejecimiento más rápidos. La vida media de las células se mide en generaciones, en gemas o células hijas producidas, y es una medida atemporal. Durante este proceso, la célula madre se vuelve más grande con cada división y acumula cicatrices de las gemas en su pared celular.

Las células madre cambian gradualmente durante el ciclo celular (Egilmez and Jazwinski, 1989) y muchos parámetros bioquímicos también cambian durante el envejecimiento replicativo, como el contenido en ROS (Laun et al., 2001) y la carbonilación de proteínas (Aguilaniu et al., 2003), antes de llegar a la fase final de senescencia caracterizada por la pérdida del control del ciclo celular (Nestelbacher et al., 2000), pérdida de heterocigosidad en células diploides y apoptosis (Laun et al., 2001). En la longevidad replicativa, la disminución de la probabilidad de supervivencia es exponencial con el incremento del número de divisiones celulares, o generaciones. Las células hijas provenientes de la célula madre envejecida nacen jóvenes, difieren de ella en tamaño y resetean a cero su reloj biológico previniendo el envejecimiento prematuro, en un fenómeno que se denomina rejuvenecimiento (Egilmez and Jazwinski, 1989; Klinger et al., 2010). Sólo algunas células hijas provenientes de células madre envejecidas que han sido cultivadas en medio con glucosa, presentan factores de muerte celular o material dañado que hace que estas células tengan una longevidad menor.

Está actualmente bien establecido que la morfología asimétrica de las células madre e hija tras la gemación va acompañada de la segregación asimétrica de los componentes celulares, en particular de proteínas y orgánulos dañados lo que permite este rejuvenecimiento de la célula hija (Aguilaniu et al., 2003; Erjavec and Nyström, 2007; Klinger et al., 2010). El material dañado se retiene en la célula madre mientras que los componentes totalmente funcionales son transmitidos a la célula hija asegurándose su rejuvenecimiento. Esta asimetría morfológica y/o funcional es la base de la teoría del envejecimiento (Erjavec et al., 2008). Dado que la eliminación de los componentes dañados tras la segregación asimétrica es importante para la longevidad de las células hijas, cobran especial importancia los mecanismos de degradación como la autofagia y el proteasoma, que son procesos esenciales que no siempre funcionan con total eficacia, lo que acaba causando finalmente, la muerte celular.

La acumulación de círculos extracromosomales de DNA ribosomal, o ERCs, es el tipo de daño asociado a la longevidad replicativa mejor caracterizado. Los ERCs se forman por recombinación homóloga dentro del DNA ribosómico, resultando en la formación de una molécula de DNA circular autoreplicativa que es asimétricamente retenida en la célula madre durante la división. Proteínas que regulan la formación de ERCs regulan a su vez la longevidad replicativa, como por ejemplo las sirtuínas. La sirtuína Sir2p es una histona desacetilasa que reprime la formación de los ERCs bloqueando la recombinación del DNA ribosomal (Steinkraus et al., 2008). También es requerida para la segregación de las proteínas citoplasmáticas dañadas mediada por el citoesqueleto de actina (Aguilaniu et al., 2003). Se han descrito otros daños importantes en el envejecimiento replicativo, como son el daño oxidativo de las proteínas y la acumulación de mitocondrias no funcionales, que también son segregados asimétricamente en la célula madre resultando en su pérdida de capacidad de respuesta a estrés oxidativo (Lai et al., 2002). En cuanto al daño mitocondrial, las células madre tienen unas 100 veces más frecuencia de pérdida de heterocigosidad que las células hijas lo cual es una medida de la inestabilidad genómica que causa, sobre todo, defectos en la biogénesis de los clusters hierro/azufre (Fe/S) (Veatch et al., 2009).

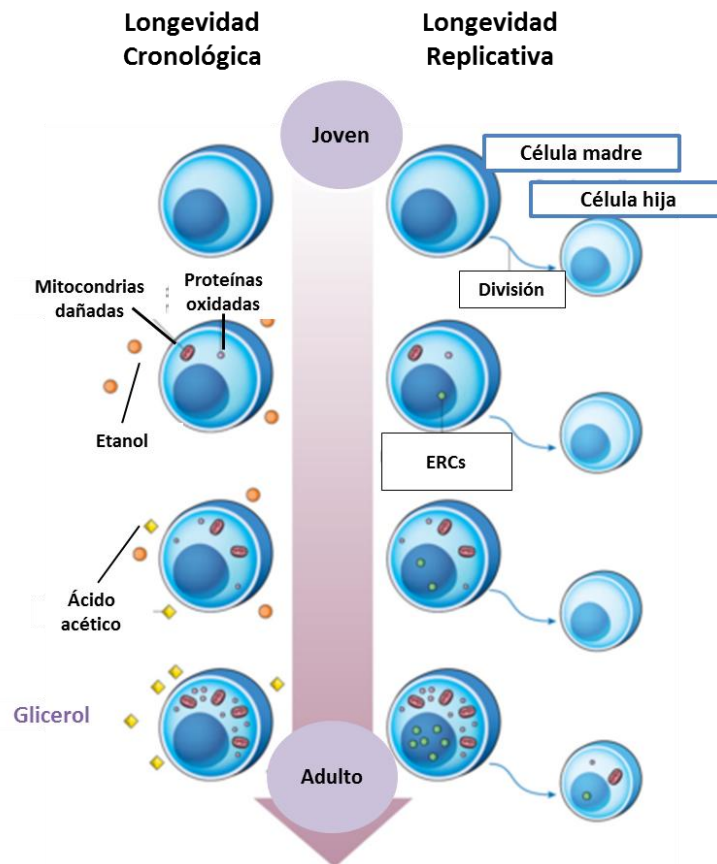


Figura I.11 Mecanismos de envejecimiento en levaduras. Longevidad cronológica (LC) y longevidad replicativa (LR). Adaptado de (Kaerberlein, 2010).

La **longevidad cronológica (LC)** es el segundo modelo de envejecimiento, característico de células post-mitóticas que no se dividen, como por ejemplo las neuronas del sistema nervioso central, en las cuales la longevidad hace referencia a la capacidad que tienen dichas células de permanecer viables con el paso del tiempo siendo, por tanto, una medida temporal. En organismos superiores, y en mamíferos en particular, no es muy común el envejecimiento cronológico, con ausencia de nutrientes, entendido a nivel de individuo. Algunas especies que hibernan, como el oso negro y el hámster turco, alternan entre estados de actividad metabólica alta y baja, y los nutrientes almacenados durante la fase activa son utilizados para sobrevivir durante la hibernación. Se ha escrito que la longevidad del hámster turco es tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de hibernación.

Sin embargo, tanto las levaduras como otros microorganismos están destinados a sobrevivir bajo condiciones adversas comúnmente encontradas en la naturaleza, como es el ayuno y/o inanición. La mayoría de microorganismos están en ambientes hostiles donde tienen que sobrevivir en una fase estacionaria de metabolismo bajo y escasos nutrientes (Werner-Washburne et al., 1996). De manera equiparable a lo observado en mamíferos que hibernan, las levaduras que experimentan una fase estacionaria en medios que soportan muy baja actividad metabólica, como agua, son más longevas que en medio rico, razón por la cual, los ensayos de envejecimiento cronológico se realizan en medios pobres en nutrientes. En levadura se estudia la longevidad cronológica manteniendo las células en estado estacionario cultivadas en un medio mínimo completo, a 30°C, durante varias semanas y midiendo la capacidad del cultivo de formar colonias en placa de medio rico con el transcurso el tiempo. Algunas mutaciones en genes de las rutas de señalización de nutrientes pueden extender la longevidad cronológica como por ejemplo, la mutación en *SCH9*, que codifica para una proteína quinasa de la ruta de señalización de nutrientes TOR/Sch9p (Fabrizio and Longo, 2003b). Cuando se compara el envejecimiento de células postmitóticas humanas y células de levadura en estado estacionario se observan muchas similitudes pero también muchas diferencias. En los ensayos de envejecimiento cronológico en levaduras, las células se encuentran en condiciones de ayuno y su supervivencia depende de la respuesta génica a estas condiciones de ayuno, así como de la reserva nutricional (glucógeno) resultando en un conjunto de cambios morfológicos y fisiológicos. Estos cambios son esenciales durante la supervivencia de las especies en la naturaleza, ya que la mayor parte de su vida, las levaduras se encuentran en fase de no división (ayuno de nutrientes).

Uno de los descubrimientos más interesantes en el campo de envejecimiento cronológico en levadura es que existen dos poblaciones celulares en los cultivos estacionarios (Allen et al., 2006). Por un lado, hay células hijas jóvenes con capacidad replicativa, que son morfológicamente diferenciadas, con baja actividad metabólica y más longevas, y por otro lado, células viejas apoptóticas, que pueden sufrir lisis y producir un crecimiento readaptativo de las células vivas por la liberación de sus componentes celulares al medio (Fabrizio and Longo, 2008). Como ya se ha comentado, un experimento estándar de LC consiste en cultivar las levaduras en un medio mínimo completo hasta que se produzca el consumo de todos los nutrientes y se pare la división celular.

Introducción

La mayoría de las células paran la división tras 2-3 días de crecimiento y su viabilidad normalmente es estudiada mediante el recuento de unidades formadoras de colonia a lo largo del tiempo, tomando los datos del día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad (Fabrizio and Longo, 2003b). En analogía con los cultivos en fase post-diáuxica, las poblaciones celulares durante el envejecimiento cronológico se caracterizan por la presencia constante de una pequeña fracción (3-8%) de células en gemación, algunas de las cuales podrían completar su división. Sin embargo, se piensa que estas células podrían tener el ciclo celular parado en S/G2 y el pH 3.5 característico de este medio minimiza la probabilidad de progresión el mismo, por lo que no afectan significativamente a las medidas de longevidad cronológica (Fabrizio et al., 2004b). Si hay una división celular, ésta es fácilmente detectable ya que el tamaño de la población aumentaría como 100 veces (Fabrizio et al., 2004a). Es interesante destacar que este fenómeno de crecimiento adaptativo a expensas de los nutrientes liberados por muerte y lisis celular tiene su importancia en la fermentación vínica para el crecimiento de bacterias lácticas que, en ciertos vinos, producen la fermentación maloláctica.

Tras el consumo fermentativo de la glucosa presente en el medio SC, se produce una transición metabólica que permite la respiración del etanol. Muchos estudios indican que el daño oxidativo producido por las ROS generadas en la mitocondria durante la respiración contribuye al envejecimiento cronológico. Además, se ha observado que la acumulación de proteínas oxidadas y otros daños en la mitocondria podrían incrementar la longevidad cronológica y promover resistencia al estrés oxidativo (Fabrizio, 2001; Rockenfeller and Madeo, 2008). El metabolismo fermentativo de los azúcares y respiratorio del etanol en la levadura produce ácido acético, que es secretado al medio extracelular produciendo su acidificación. Además, el ácido acético es suficiente para causar envejecimiento cronológico (Figura I.11) y se ha observado que las células de levadura inducen procesos de apoptosis en su presencia (Fabrizio and Longo, 2008; Rockenfeller and Madeo, 2008). Por este motivo, el estudio de la longevidad cronológica no sólo contribuye al entendimiento de las bases moleculares del envejecimiento si no a elucidar las modificaciones clave ocurridas en las células senescentes que podrían ser relevantes en genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas o cáncer.

Entre la longevidad cronológica y la longevidad replicativa existe una cierta interacción. Una respuesta compartida entre levaduras, humanos y otros muchos organismos, y compartida también entre LC y LR, es el incremento de la longevidad mediante la inhibición de la ruta de señalización por nutrientes TOR (Harrison et al., 2010; Kaeberlein, 2010; Powers et al., 2006). Las rutas pro-envejecimiento en levaduras, TORC1/Sch9p y Ras/Adenilato ciclasa/PKA promueven el envejecimiento y la muerte celular tanto en LC como en LR. Sin embargo, también existen efectos contrapuestos, como la extensión de la LC inducida por una baja actividad de la proteína quinasa Rim15p y de los factores transcripcionales de resistencia a estrés Msn2/4p (Fabrizio, 2001; Fabrizio and Longo, 2003a; Wei et al., 2008), mientras que esta misma circunstancia limita la extensión de la LR. Otro ejemplo es el requerimiento de la superóxido dismutasa mitocondrial Sod2p para la extensión de la LC, mientras que su sobreexpresión acorta la LR. Estos datos sugieren que la relación entre LR y LC es compleja y que en función de las condiciones, las diferentes rutas reguladoras podrían tener papeles opuestos en estas rutas.

3.2 Complejo SAGA

Una de las modificaciones postraduccionales más comunes es la adición de residuos acetilo a los grupos amino de las lisinas de las proteínas, proceso llamado acetilación. El ejemplo mejor caracterizado es la modificación de los residuos de lisina presente en las histonas (Shahbazian and Grunstein, 2007). Dicha modificación, conlleva un cambio en la condensación de la cromatina de manera que la actividad acetiltransferasa genera un estado de menor condensación de la cromatina y, por ello, una activación transcripcional, mientras que las desacetilasas promueven el efecto contrario, la compactación de la cromatina y la represión transcripcional.

Estudios anteriores de nuestro grupo han demostrado el papel de la acetiltransferasa Gcn5p en autofagia y longevidad cronológica (Orozco et al., 2012c). Gcn5p es una proteína perteneciente a varios complejos multiproteicos, entre ellos el complejo transcripcional SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetiltransferasas), implicado en la transición de un estado de cromatina inactivo y compacto a uno activo y abierto, prerequisite para la transcripción (Suganuma and Workman, 2008). La familia de complejos encargados de realizar estas modificaciones, que tienen como subunidad catalítica a la acetiltransferasa Gcn5p, se denomina GNAT. En levaduras, la familia GNAT incluye Rtt109p, que es una desacetilasa, SAGA, SLIK (Saga-LIKE), ADA y HAT. En humanos se encuentra el complejo STAGA que finalmente se simplificó a SAGA por su similitud.

El complejo SAGA está compuesto por 21 proteínas conservadas que están organizados en diferentes submódulos. Algunas de estas subunidades están bien descritas, como Ada, Spt y Tafs (Daniel and Grant, 2007). SAGA también comprende el producto del gen *TRA1* que se ha observado que interactúa con varios factores de transcripción, como Gcn4p (Brown, 2001). Además hay muchas más subunidades en este complejo como Ubp8p (Henry et al., 2003), Sgf11p, Sgf29p, Sgf73p y Sus1p (Rodríguez-Navarro, 2009). La primera evidencia de que SAGA contenía una actividad desubiquitinasa procedió del laboratorio de Grant y Berger (2003). Mostraron que Ubp8p es una desubiquitinasa asociada al complejo SAGA. El módulo de desubiquitinización, DUB, está compuesto además por otras proteínas como Sgf11p, que junto con Ubp8p, es necesaria para desubiquitinar la histona H2B.

Los genes de las proteínas del módulo SPT (Supresor Of Ty) han sido clasificados en diferentes grupos en función del fenotipo de su mutación. Por ejemplo, mutaciones en *SPT3*, 7, 8 y 15 causan un defecto en la esporulación (Yamaguchi et al., 2001). La delección del núcleo de componentes *SPT20* y *ADA1* altera la composición del complejo, demostrando la importancia de estas dos proteínas en la estructura de SAGA. El mutante *spt20Δ* presenta desensamblaje del complejo SAGA, ya que Spt20p es una proteína estructural esencial para el correcto ensamblaje del mismo pero se ha visto que algunos módulos sí que están formados lo que demuestra que el ensamblaje del complejo SAGA no ocurre proteína a proteína, sino que se ensamblan las proteínas de los diferentes módulos y luego los módulos entre sí. El análisis proteómico de los componentes que copurifican con Ada2p y con Ubp8p en el mutante *spt20Δ* revela que el módulo HAT y el módulo DUB están intactos (Han et al., 2014; Lee et al., 2011; Samara and Wolberger, 2011).

La ausencia de subunidades que no son esenciales para la integridad del complejo, como Spt3p y Gcn5p, no afectan a la asociación de otras proteínas con el complejo SAGA (Wu et al., 1997).

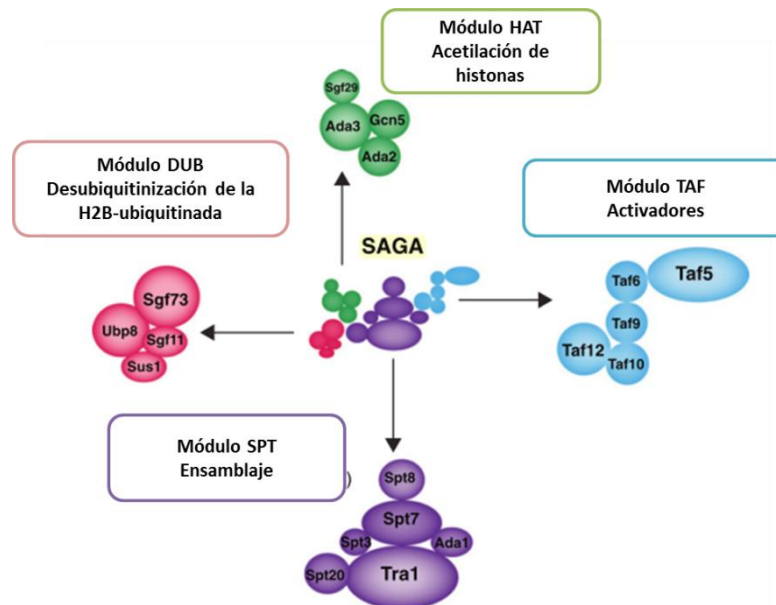


Figura I.12 Componentes del complejo SAGA. Módulos en los que se divide el complejo SAGA y proteínas que lo componen. Adaptado a (Samara and Wolberger, 2011).

El complejo SAGA también actúa durante la elongación de la transcripción, favoreciendo la eliminación de la barrera física impuesta por los nucleosomas a la maquinaria de transcripción (Fuchs et al., 2009). Algunos autores proponen que la ubiquitinización de H2B ocurre a la vez que la transcripción y podría estimular la elongación de la transcripción (Laribee et al., 2007). La asociación estable entre los factores activadores de la transcripción (TAFs) y la cromatina en transcripción depende de la capacidad de desubiquitinar H2B. SAGA también favorece la elongación mediante la acetilación de histonas a través de Gcn5p, promoviendo el desensamblaje de nucleosomas y, por tanto, la accesibilidad de RNA polimerasa II durante el proceso (Govind et al., 2007). En las regiones codificantes, diferentes subunidades de SAGA pueden modular el proceso de elongación a través de la acetilación por Gcn5p, desubiquitinización por Ubp8p y la interacción con los factores de exportación del mRNA a través de Sus1p. El transporte del mRNA fuera del núcleo es un paso esencial que es necesario para la expresión génica. Durante su síntesis, el mRNA es empaquetado en mRNPs y exportado a través del complejo de poro nuclear (NPC). Se han descrito conexiones entre los factores relacionados con la transcripción y los relacionados con la exportación del mRNA, como la proteína Sus1p que forma parte del complejo SAGA y también interacciona con la proteína Trex2p, asociada con el complejo de poro nuclear, de manera que Sus1p conecta los procesos de exportación de mRNAs y de elongación de la transcripción (Pascual-García and Rodríguez-Navarro, 2009).

Se ha demostrado el papel del complejo SAGA en la longevidad. Estudios recientes han mostrado que el módulo DUB del complejo SAGA regula la longevidad replicativa a través de la interacción con la sirtuína Sir2p, y que los mutantes en *UBP8*, *SGF73* Y *SGF11* (componentes del módulo DUB del complejo SAGA y el complejo SLIK) presentan una extensión de la longevidad replicativa (McCormick et al., 2014).

3.3 Papel de la respuesta a estrés oxidativo

Los microorganismos han jugado un papel muy importante en la caracterización de enzimas antioxidantes y la identificación de fuentes y de dianas de ROS. *S. cerevisiae* contiene, como se ha detallado en el apartado 2 de esta Introducción, dos superóxido dismutasas: Sod1p o Cu-Zn-SOD citosólica y Sod2p o Mn-SOD mitocondrial. Ambas son necesarias para la extensión de la longevidad (Longo et al., 1996), siendo Sod2p requerida tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de bajo oxigenación y Sod1p sólo en condiciones de normoxia. Además, la sobreexpresión de los genes *SOD1* y *SOD2* incrementa la longevidad cronológica en un 30% (Fabrizio et al., 2003). Desde que la teoría del envejecimiento por los radicales libres fue propuesta (Harman, 1956), se han realizado muchos estudios sobre el efecto de las ROS en el envejecimiento ya que, de acuerdo, con ella, tanto la producción de ROS por la mitocondria, como el nivel de distintos marcadores bioquímicos de daño oxidativo aumentan con la edad (Aguilaniu et al., 2003; Laun et al., 2001).

Un incremento en el estrés oxidativo intracelular y en las ROS es detectado tanto en la LC como en la LR en ausencia de cualquier factor externo (Fabrizio et al., 2004b). Durante la gemación, la célula madre retiene las proteínas dañadas causadas por el estrés oxidativo (segregación asimétrica) y el reloj biológico de la célula hija se vuelve cero (Aguilaniu et al., 2003) Los niveles de carbonilación de proteínas y de otras formas de daño oxidativo a proteínas son mayores en las células madre que en las hijas. Proteínas de respuesta a estrés (Hsp60/70) y enzimas del metabolismo de la glucosa son carboniladas en células envejecidas. En las células envejecidas cronológicamente han acumulado factores de muerte los cuales pueden limitar en potencial replicativo de estas células, otro ejemplo de la conexión entre LC y LR.

La mitocondria es la mayor fuente de ROS. La producción incrementada de ROS por parte de las mitocondrias podría explicarse por una respiración ineficiente o por defectos en su actividad en células envejecidas. Si se elimina la función del DNA mitocondrial mediante la construcción de mutantes *petite* se sigue observando la formación de ROS y una LC más corta. Sin embargo, en levaduras, se ha observado que ciertos mutantes son mucho más longevos por el incremento de las ROS intracelulares (Kharade et al., 2005) y en *Drosophila melanogaster* se ha visto que la inhibición de la producción de ROS no extiende la vida media (Miwa et al., 2004). También se ha estudiado que algunos compuestos descritos como antioxidantes producen daño oxidativo en la célula, peroxidación de lípidos, y un acortamiento de la longevidad. En este sentido, la expresión de genes de respuesta a estrés podría resultar en un mecanismo de adaptación y un fenotipo más resistente que aumentaría la capacidad de sobrevivir en condiciones desfavorables (Wei et al., 2008)

3.4 Señalización de nutrientes

El envejecimiento no es meramente un proceso accidental, sino que está regulado por las condiciones externas. El principal factor de extensión de la longevidad es la restricción dietaria o calórica, disminución del aporte de nutrientes sin inducir la malnutrición. En eucariotas esta disminución del aporte de nutrientes extiende tanto la longevidad replicativa como la cronológica (Kaeberlein, 2010). En levadura la restricción calórica hace referencia a la disminución del aporte de glucosa (reducción al 0.5-0.05%). La denominada restricción dietaria hace referencia a la disminución del aporte de cualquier nutriente sin inducir la malnutrición. La mayoría de organismos, desde bacterias hasta mamíferos, responden a la restricción calórica elevando la resistencia a los oxidantes. Por ello las rutas de señalización de nutrientes son clave en la modulación de la longevidad celular. Los nutrientes no sólo proveen energía a las células y organismos, también son reguladores cruciales de su funcionamiento a través de esas rutas que señalizan su disponibilidad y que están conservadas desde levaduras hasta humanos. La levadura *S. cerevisiae* utiliza preferentemente la glucosa como fuente de carbono y energía, a través del metabolismo fermentativo, por lo que la ruta de represión por glucosa ha tenido un especial interés ya que está relacionada con el control de la fermentación alcohólica, la característica metabólica más distintiva de esta especie, que además tiene enorme relevancia industrial (Carlson, 1999).

3.4.1 Ruta Snf1p

En presencia de azúcares fermentables en el medio, la levadura *S. cerevisiae* activa un mecanismo regulador que controla transcripcionalmente el nivel de actividad de un conjunto de enzimas y otras proteínas relacionadas con el transporte y metabolismo de fuentes de carbono alternativas, así como con el metabolismo respiratorio (revisado en (Broach, 2012)), denominado ruta de represión por glucosa. Este mecanismo regulador es dependiente de Snf1p, una proteína quinasa perteneciente a la familia de quinasas AMPK altamente conservadas en eucariotas y requerida para la homeostasis energética (Hedbacker and Carlson, 2006), ya que tiene un papel central en la detección y respuesta a condiciones de bajo nivel energético celular. En *S. cerevisiae*, Snf1p responde principalmente a una disminución en los niveles de glucosa, que la activan, y promueve, en esas condiciones, un metabolismo respiratorio, la acumulación de glucógeno, la gluconeogénesis, el proceso de autofagia, la activación del ciclo del glioxilato y el envejecimiento, entre otros procesos (Lin et al., 2003; Usaite et al., 2009). La activación de Snf1p reprime los procesos anabólicos, como la biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos a través de la inactivación de la acetil-CoA carboxilasa y algunos factores de transcripción, como Gcn4p (Chumnanpuen et al., 2012). Snf1p activa también la transcripción de factores como Cat8p, Sip4p y Rsd2p responsables de la inducción de genes de la gluconeogénesis, genes relacionados con la β -oxidación de los ácidos grasos y genes del metabolismo del etanol. La sobreexpresión del gen *SNF1* disminuye la vida media.

Snf1p controla también, la expresión de genes a través del remodelamiento de la cromatina.

Durante el ayuno de glucosa, Snf1p media la acetilación de la histona H3 y el reclutamiento de la RNA polimerasa II a los promotores de genes como *HXT2*, *HXT4* e *INO1*, que codifican para dos transportadores de hexosas y una inositol-3-fosfato sintasa respectivamente. Recientemente, se ha observado el papel de Snf1p en la fosforilación del factor de transcripción Hcm1p que está implicado en la adaptación a las condiciones de estrés inducidas por nutrientes cuando se cambia de metabolismo fermentativo de la glucosa a respiratorio (Rodríguez-Colman et al., 2013). Además, se ha observado que Snf1p fosforila y activa a Gcn2p, la quinasa de la ruta del control general de aminoácidos, en células tratadas con 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), que provoca un ayuno de histidina, lo que promueve la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α (Hong and Carlson, 2007).

3.4.2 Ruta Ras/cAMP/PKA

En levadura, una parte de la detección y señalización de la glucosa extracelular es mediada por la ruta PKA, que en presencia de glucosa reprime mecanismos de tolerancia a estrés y adaptativos, estimulando la fermentación y la proliferación celular (Smets et al., 2010; Thevelein et al., 2000). La actividad de PKA está fuertemente influenciada por todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de la levadura. Tal como se muestra en la Figura I.14, esta ruta es un sistema de detección dual. Por un lado, la glucosa extracelular es detectada a través del sistema GPR, compuesto por Gpr1p y Gpr2p, y por otro lado, la glucosa intracelular es detectada por un sistema dependiente de su fosforilación mediada por las hexoquinasas, que activan las proteínas Ras (Rolland et al., 2000).

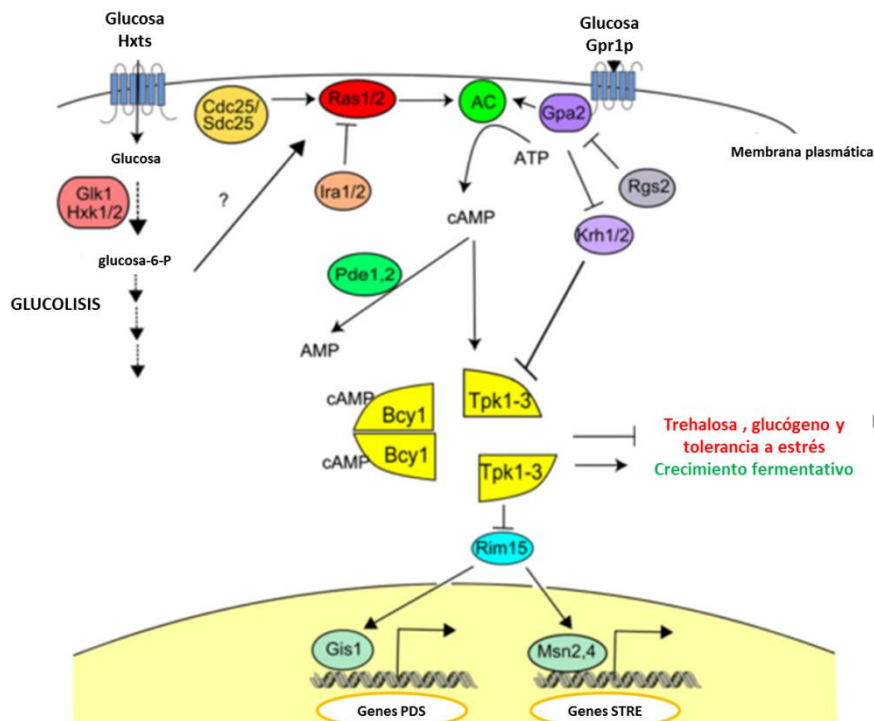


Figura I.14 Rutas reguladas por la disponibilidad de glucosa. Ruta PKA-cAMP. Adaptado de (Conrad et al., 2014).

La adenilato ciclasa (AC) es controlada por dos proteínas G que median cada una un brazo de la señalización por glucosa. Ambos procesos de captación de glucosa, producen la activación de la adenilato ciclasa, codificada por el gen *CYR1* (Kataoka et al., 1985), lo que incrementa el nivel de cAMP. La protein quinasa A es una proteína heterotetramérica que tiene dos subunidades catalíticas y dos reguladoras (Tpk1-3p y Bcy1p). La unión del cAMP a las subunidades reguladoras causa su disociación de las subunidades catalíticas, activando PKA. El cAMP, a su vez, es degradado por las fosfodiesterasas de baja y alta afinidad, Pde1p y Pde2p respectivamente. El primer mutante con longevidad cronológica incrementada descrito en levadura fue el mutante *ras2Δ* (Longo, 1999). *RAS2* codifica para una de las dos proteínas G conservadas que activan a PKA vía adenilato ciclasa, Cyr1p. Esta delección produce una extensión a cerca del doble de longevidad cronológica y promueve un incremento de la resistencia al estrés oxidativo y térmico (Fabrizio and Longo, 2003b; Gourlay and Ayscough, 2006). En presencia de glucosa, la ruta Ras/PKA media la activación de un programa transcripcional promotor del crecimiento que depende, en parte, de la inhibición de los factores de resistencia a estrés Msn2/4p (Zaman et al., 2009). La función de estos factores es clave para la extensión de la LC en los mutantes *ras2Δ* y *cyr1Δ* (Fabrizio, 2001; Fabrizio et al., 2005). El factor de transcripción Gis1p contribuye a la disminución de la actividad PKA en la LC y resistencia al estrés (Smets et al., 2010; Wei et al., 2008). La ruta PKA también está regulando enzimas importantes de la glucólisis fosforilando directamente algunas enzimas citosólicas y modulando la actividad, por ejemplo de la fosfofructoquinasa 2 (Dihazi et al., 2003). Un importante intermediario es la regulación de la expresión génica es la proteína quinasa Rim15p (Cameroni et al., 2004). PKA fosforila a la proteína quinasa Rim15p, inhibiéndola. A su vez Rim15p es un activador de 3 factores de transcripción participantes en el cambio postdiáxico, regulación que realiza a través de Msn2/4p y las secuencias STRE, por lo que en condiciones de activación de la ruta, cuando hay glucosa en el medio, estos genes estarán reprimidos.

3.4.3 Ruta TOR/Sch9p

La ruta TOR, de "Target Of Rapamycin", también actúa regulando la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento celular. Desde levaduras a mamíferos, la inactivación de *TOR* afecta a muchos mecanismos relacionados con el metabolismo, el crecimiento y la longevidad celulares. A diferencia de otros eucariotas *S. cerevisiae* poseen 2 genes TOR (Helliwell et al., 1994) y, por tanto, 2 proteínas Tor. Tor1p y Tor2p son proteínas de 282 kDa que tienen alrededor de un 67% de homología con la proteína TOR humana. Forman parte de la familia de las fosfatidilinositol proteín quinasas. El complejo TORC1 contiene principalmente Tor1p, mientras que Tor2p puede suplirla, además de las proteínas Kog1p, Lst8p y Tco89p. TORC1 es sensible a la rapamicina, su activación afecta a la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, la transcripción, el ciclo celular, la meiosis, la captación de nutrientes y la autofagia. El complejo TORC2 contiene sólo Tor2p asociada con las proteínas Avo1-3p, Bit61p y Lst8p (Reinke et al., 2004), no es sensible a rapamicina y afecta a la organización del citoesqueleto de actina, la endocitosis, la síntesis de lípidos y la supervivencia celular.

La rapamicina se une a la proteína Frp1p, o inmunofilina, una cis-trans peptidil-propil isomerasa que al interactuar con Tor1p en ese estado provoca su inactivación. TORC2 no es sensible a inhibición por rapamicina porque el dominio de interacción con Frp1p está protegido por interacción con Avo1p.

Compuestos naturales como la cafeína, a concentraciones bajas (milimolar), producen la inhibición de TORC1 (Reinke et al., 2006; Wanke et al., 2008) así como la curcumina (Beevers et al., 2009; Zhou et al., 2010). Otros compuestos químicos, como son algunos herbicidas, también son usados para el estudio de la ruta por su capacidad de inhibición indirecta de TOR (Jia et al., 2000). La inhibición farmacológica de TORC2 en levaduras se observó recientemente con la caracterización de una imidazoquinolina, denominada NVP-BHS345 (BHS), que es un inhibidor competitivo de TOR, inhibiendo ambos complejos (Rispalet et al., 2015).

En presencia de nitrógeno Tor1p fosforila a la proteína quinasa Rim15p, inactivándola, lo que impide la inducción de genes implicados en rutas de respuesta a estrés vía Msn2/4p, genes implicados en la fase estacionaria vía Gsp1p, genes implicados en el metabolismo del nitrógeno dependiente de la ruta NCR o Gln3p, y genes de la respuesta retrógrada. También fosforila varios residuos de aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína quinasa Sch9p, lo que promueve la biogénesis de ribosomas y la traducción (Urban et al., 2007).

Las proteínas quinazas S6K y Sch9p son los sustratos de fosforilación de TOR mejor caracterizados. Ambas pertenecen a la familia de proteínas quinazas AGC. La proteína ribosomal S6 (Rps6p) ha sido encontrada como una de las primeras proteínas ribosomales susceptibles de fosforilación (Trauch et al., 1973). Está conservada desde levaduras hasta mamíferos. En levaduras, Rps6p tiene dos sitios de fosforilación, las serinas 232 y la 233 que están conservadas en mamíferos (235 y 236) (Figura I.15). La fosforilación de Rps6p es sensible a nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y diferentes condiciones de estrés. Recientemente se ha observado que la fosforilación de Rps6p dependiente del complejo TORC1 ocurre a través de la proteína quinasa Ypk3p y la dependiente del complejo TORC2 a través de Ypk1p e Ypk2p (Yerlikaya et al., 2015).

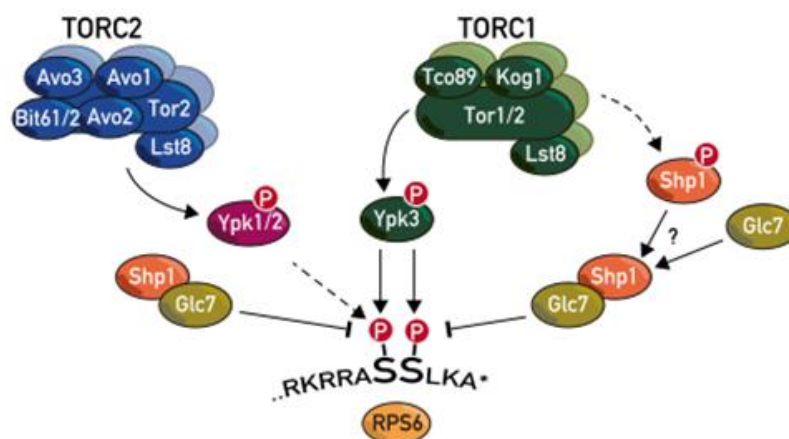


Figura I.15 Regulación del complejo TOR a la fosforilación de la Serina 232 y 233 de Rps6p. Adaptado de (Yerlikaya et al., 2015)

En 2001 se demostró que el papel de la ruta TOR se encuentra conservado desde levaduras hasta mamíferos. Por un lado, se describió que la disminución de la actividad de Sch9p extiende la longevidad cronológica más de 3 veces respecto de la cepa silvestre (Fabrizio, 2001). Esta extensión de la longevidad obtenida mediante la inactivación de la ruta de señalización y rutas promotoras de crecimiento produce una activación del programa de supervivencia celular caracterizado por un incremento en la protección celular y por la acumulación de carbohidratos de reserva (Longo and Finch, 2003) . *S. cerevisiae* extiende la longevidad cuando los nutrientes son limitados, parando su metabolismo celular y su división. Esto ocurre, tanto si entra en una fase estacionaria como si se entra en esporulación. Muchos de los fenotipos de los mutantes con mayor longevidad cronológica son comunes a los observados en la fase estacionaria, como la alta resistencia al estrés, y son las mismas rutas las que controlan tanto la LC como la entrada en fase estacionaria (Fabrizio and Longo, 2003b). Muy recientemente, se ha demostrado el papel del complejo TOR de mamíferos en la regulación de la traducción, tanto en su inicio, fosforilando al factor de iniciación 4E-BP y a la proteína S6K, como en la elongación, fosforilando e inactivando a la protein quinasa del factor de elongación eIF2 Gcn2p (Gonskikh and Polacek, 2017).

3.4.4 Respuesta retrograda

Otra ruta que regula la disponibilidad de nitrógeno es la represión por catabolito de nitrógeno, o NCR (“Nitrogen Catabolite Repression”). *S. cerevisiae* puede utilizar un amplio rango de fuentes de nitrógeno siendo sus preferencias metabólicas (de mayor a menor): glutamina, serina, amonio, glutamato y prolina. En ausencia de fuentes de nitrógeno preferentes o ayuno de nitrógeno, se activa la ruta NCR por inhibición de TORC1, activándose un conjunto de genes necesarios para la asimilación de compuestos nitrógenados, como *GAT1* y *GLN3*, codificantes de factores de transcripción, *GDH1*, codificante de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, y *GCN1*, codificante de un regulador positivo de la protein quinasa del GAAC, Gcn2p. Los factores de transcripción Gln3p y Gat1p estimulan la expresión de un conjunto de genes de respuesta a la disponibilidad de nitrógeno y se ha observado que la delección de ambos genes extiende la LC (Chen and Powers, 2006).

En relación con la repuesta a estrés y a nutrientes, la **ruta retrógrada** tiene un papel importante, ya que coordina la comunicación entre el núcleo y la mitocondria (Liu and Butow, 2006). Una de las principales funciones de la ruta de respuesta retrógrada es regular el flujo de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, regulación que es ejercida a través de los factores de transcripción de la ruta Rtg1/3p que controlan la expresión de los genes de cuatro enzimas de dicha ruta. En condiciones de daño mitocondrial o disminución del potencial de membrana mitocondrial, el sensor de este daño, Rtg2, permite, a través de la defosforilación de Rtg3p, el traslado de los factores de transcripción Rtg1/3p al núcleo donde forman un complejo transcripcional muy similar a SAGA llamado SLIK (Saga-LIKe) y activan genes de respuesta a estrés y de respiración. Un elemento clave en la regulación de la respuesta retrógrada es la interacción entre el inhibidor Msk1p y Rtg2p. Msk1p promueve la fosforilación de Rtg3p evitando su translocación al núcleo. Además, parece hay una conexión entre Rtg2p, la ruta TORC1 y el complejo transcripcional SAGA (Jazwinski, 2005; Pray-Grant et al., 2002; Torelli et al., 2015). La delección de *RTG2* o de *MKS1* extiende la LC.

3.4.5 Control General de Aminoácidos (GAAC)

Cuando las células están en ayuno de uno o más aminoácidos, la ruta GAAC es activada, resultando en la inhibición global de la traducción y la expresión preferente de los alrededor de 57 genes regulados por el factor de transcripción Gcn4p, relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, la utilización del nitrógeno, la señalización y la expresión génica (Hinnebusch, 1986; Natarajan et al., 2001; Staschke et al., 2010). La rápida inhibición de la síntesis de proteínas por la activación de la ruta GAAC también ocurre en respuesta a otros tipos de estrés, como el oxidativo, en limitación de glucosa y de nitrógeno, en presencia de fuentes de nitrógeno no preferentes, en presencia de sal, de metales, etc, en general, cuando la célula tiene que readaptar la traducción hacia la síntesis de factores específicos relacionados con la preservación de la energía y la protección frente a estrés. La reducción de la tasa de crecimiento debida a la respuesta a condiciones de estrés puede ser la causa de la activación de la ruta GAAC en estas condiciones (Simpson and Ashe, 2012). En cuanto a su mecanismo de acción (figura I.16), bajo condiciones óptimas, el factor de iniciación de la traducción eucariota eIF2 α está unido a GTP iniciando la formación del complejo ternario (CT), que está constituido por el mencionado factor de iniciación eIF2 α , GTP y el metionil-tRNA iniciador. Una vez formado el CT, se recluta la subunidad 40 del ribosoma para formar el complejo de preiniciación. Este complejo se une al codón de inicio AUG y después se une la subunidad 60S, empezando la traducción (Jackson et al., 2010). Bajo ayuno de aminoácidos, los niveles de tRNAs no cargados aumentan, lo que activa la fosforilación de la serina 51 de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eIF2 α por la proteína quinasa Gcn2p (Dever, 2002; Gomez et al., 2002).

Gcn2p tiene un dominio quinasa que es activado alostéricamente por la unión de un tRNA no cargado. La fosforilación de eIF2 α reduce la formación del complejo ternario y una parada en la traducción global, a la vez que aumenta selectivamente la traducción de Gcn4p, un factor de transcripción que activa genes de respuesta a GAAC mediante su unión a la secuencia (GA(C/G)TCA) presente en sus promotores. Estudios recientes han demostrado la conexión de la ruta GAAC con otras rutas de señalización en respuesta a nutrientes, como la ruta TORC1 (Cherkasova and Hinnebusch, 2003; Staschke et al., 2010). Se ha observado que la activación de Gcn2p está influenciada por TORC1, además se ha observado la interacción de Gcn4p con TORC1 así como con los factores de transcripción de tipo GATA de la ruta de represión por nitrógeno, o NCR, en concreto con Gln3p. La combinación de la delección de *GCN4* y *GLN3* produce una alta resistencia a la rapamicina reflejando que funciones importantes de TORC1 ocurren a través de su efecto sobre estos factores de transcripción (Staschke et al., 2010). También Snf1p regula la ruta GAAC, esta vez en respuesta a los niveles de glucosa (Shirra et al., 2008). El agotamiento de glucosa causa una rápida inhibición de la traducción, en particular de los genes de la biogénesis de ribosomas (Simpson and Ashe, 2012). Bajo estas condiciones, Snf1p inhibe a Gcn4p ya que se ha observado que la inactivación de Snf1p produce la inducción de genes dependientes de este factor de transcripción (Shirra et al., 2008). Además, bajo ayuno de aminoácidos Snf1p colabora para activar a la proteína quinasa clave del GAAC, Gcn2p.

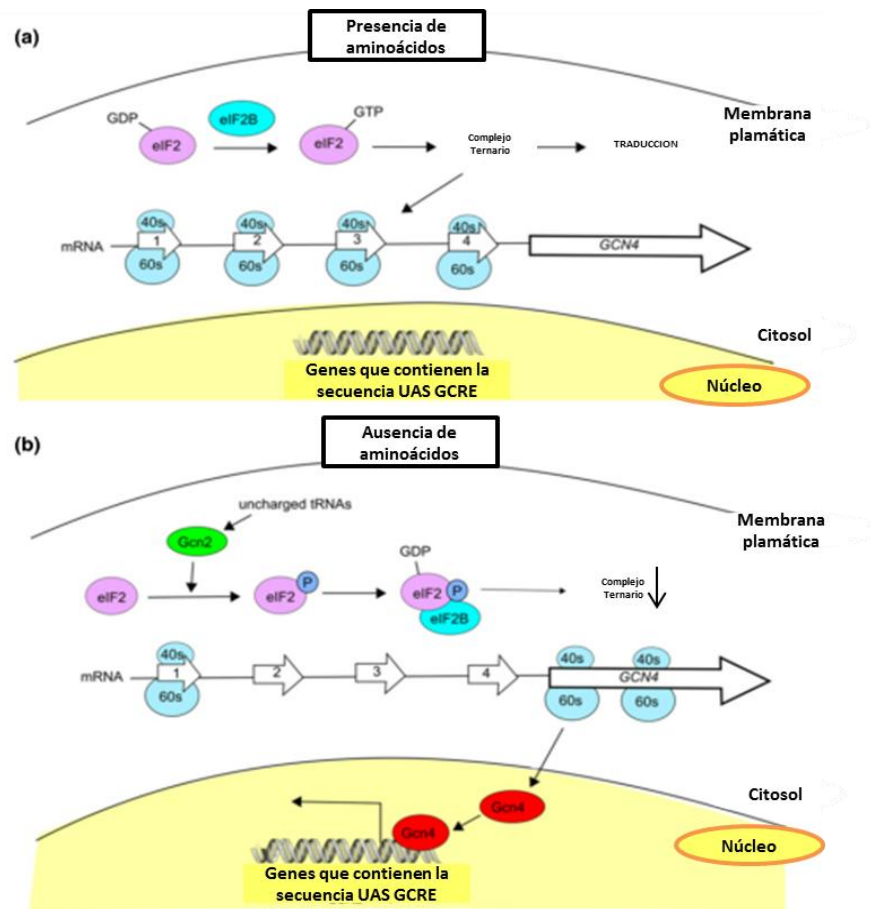


Figura I.16 Rutas reguladas por la disponibilidad de aminoácidos, GAAC. Adaptado de (Conrad et al., 2014). En presencia de aminoácidos se continúa con una traducción global (A) mientras que en ausencia de aminoácidos se fosforila el factor de iniciación eIF2 α , activando al factor de transcripción Gcn4p que, a su vez, activa los genes de respuesta a la ausencia de aminoácidos (B).

Se ha observado también la conexión de la respuesta a estrés con la ruta GAAC, esta vez en levaduras de fisión. En *Schizosaccharomyces pombe* se ha detectado fosforilación de eIF2 α dependiente del H₂O₂ (Krohn et al., 2008), lo que no ocurre en levaduras de gemación como *S. cerevisiae* (Knutsen et al., 2015). Es posible que en *S. cerevisiae* la conexión entre respuesta a estrés y GAAC sea indirecta ya que si que se ha observado influencia mútua entre el estrés oxidativo, la restricción calórica y la ruta GAAC (Molin et al., 2011), concretamente se describió una conexión entre la restricción calórica, la ruta PKA, la peroxirredoxina Tsa1p y la quinasa Gcn2p, ésta última necesaria para el aumento de los niveles de la sulfirredoxina Srx1p y resistencia al estrés bajo presencia de H₂O₂. En condiciones de crecimiento en glucosa la ruta PKA está activa e inhibiendo a la quinasa Gcn2p por lo que incluso en presencia de un oxidante como el H₂O₂ no hay un aumento de los niveles de la proteína Srx1p y Tsa1p se encontrará oxidada.

En condiciones de restricción calórica y presencia del agente oxidante, la ruta PKA está inactivada, la protein quinasa Gcn2p aumenta los niveles de la sulfirredoxina Srx1p y esta permite que Tsa1p podría volver a su estado reducido, promoviendo la longevidad replicativa.

La respuesta a la disponibilidad de fuente de nitrógeno es muy diversa y recientemente se ha observado la activación diferencial de las rutas en función del tipo de fuente de nitrógeno (Airoidi et al., 2016). Además, no todos los aminoácidos actúan de la misma manera para promover la LC (Alvers et al., 2009). La limitación de aminoácidos, es un inductor importante de la autofagia (ver más adelante), ya que los aminoácidos son los nutrientes más importantes a reciclar por autofagia para la supervivencia celular (Onodera and Ohsumi, 2005).

3.5 Autofagia

La autofagia es el proceso que permite el reciclaje de componentes intracelulares a través de la vacuola o de los lisosomas (McCormick et al., 2014) y, en realidad, incluye diferentes procesos. Una autofagia no selectiva sería la macroautofagia que consiste en la degradación en la vacuola o en los lisosomas (en eucariotas superiores) de componentes citoplasmáticos de manera no selectiva, como es la degradación del marcador aldehído deshidrogenasa Ald6p en condiciones de ayuno de nitrógeno (Onodera and Ohsumi, 2004). Este proceso es esencial para la supervivencia celular cuando los nutrientes comienzan a escasear. Además, en algunos eucariotas, la macroautofagia es esencial también durante la diferenciación. Cuando se induce la macroautofagia, una doble membrana se forma alrededor de una parte del citoplasma dando lugar a un autofagosoma. Una vez formado el autofagosoma, su membrana se fusiona con la membrana de la vacuola dando lugar a una estructura llamada cuerpo autolítico que entra en el lumen vacuolar donde es reciclado por las hidrolasas a componentes reutilizables. Las proteínas estructurales y reguladoras encargadas de todo el proceso autofagocítico están codificadas por la familia de genes *ATG* (Klionsky et al., 2003). Recientemente, se ha descrito el papel de las tiorredoxinas citosólicas en la regulación de la autofagia a través de la proteína Atg4p (Perez-Perez et al., 2014). Además de la macroautofagia, la degradación de componentes celulares puede ocurrir vía microfagia, un proceso que se caracteriza por invaginación directa del componente citoplasmático a degradar en la membrana vacuolar (Kunzt et al., 2004). Este proceso no es dependiente de las proteínas codificadas por los genes *ATG*.

La protein quinasa Tor1p regula el crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y al estrés celular, incluyendo también el control de la autofagia. Durante condiciones de disponibilidad de nutrientes, el complejo en el que se encuentra Tor1p, *TORC1*, inhibe la macroautofagia pero permite la ruta selectiva Cvt “Cytoplasm-to-Vacuole-Targeting”. Por debajo de *TORC1* se encuentran unas fosfatasa del tipo 2A, las cuales regulan la fosforilación del complejo Atg1p (Cebollero and Reggiori, 2009). Este complejo es esencial para todas las formas de autofagia y su núcleo está compuesto por las serina-treonina protein quinasas Atg1p y Atg13p. Bajo condiciones de disponibilidad de nutrientes, *TORC1* bloquea la autofagia por hiperfosforilación de Atg13p afectando así la formación del complejo Atg1p por la disminución de la afinidad entre estas dos proteínas (Figura I.13).

Introducción

En limitación de nutrientes, TORC1 se inactiva y ocurre la defosforilación parcial de Atg13p lo cual permite su unión a Atg1p y la activación la macroautofagia. La disminución de la capacidad celular de macroautofagia (a partir de ahora, simplemente autofagia) con la edad se ha descrito en diversos organismos. Estudios de los factores implicados en la longevidad cronológica en levaduras identificaron muchos mutantes de vida media corta que presentaban defectos en la autofagia (Matecic et al., 2010). Además, con la edad, también disminuyen los mecanismos de control de calidad de los procesos celulares lo que, junto con la autofagia, produce la acumulación de orgánulos no funcionales, moléculas dañadas, situación todavía más crítica en células post-mitóticas. La inhibición genética y/o farmacológica de la autofagia está correlacionada con una disminución de la longevidad. En levaduras, la inhibición de la ruta conservada TOR, la ruta Ras/cAMP-PKA y la proteína Sch9p, las cuales integran las rutas de señalización de nutrientes, promueven la longevidad. Además, estas rutas son inhibidores de la autofagia reforzando que tanto la autofagia como el envejecimiento están coordinados por diferentes rutas celulares (Sampaio-Marques et al., 2011).

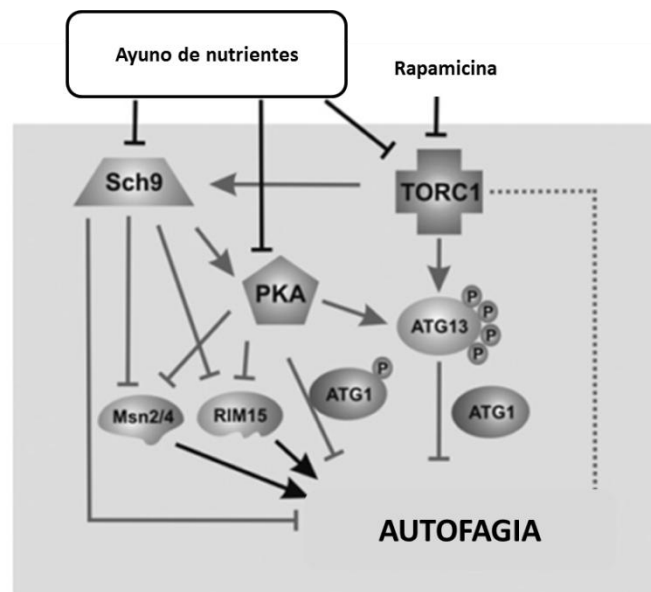


Figura I.13 Cuadro resumen de la regulación de la autofagia. Adaptado de (Sampaio-Marques et al., 2011)

A pesar de que la autofagia es un proceso necesario y citoprotector y que promueve la supervivencia de las células, puede llegar a ser un proceso autodestructivo si sobrepasa unos límites, por su contribución y participación en la muerte celular. Estudios realizados con una proteína autoagregante generadora de un estrés proteotóxico, la α -sinucleína, han indicado que una excesiva y persistente activación de la autofagia puede causar muerte celular (Sampaio-Marques et al., 2011).

OBJETIVOS

En el marco de la complejidad de las rutas de señalización por nutrientes y de los diferentes mecanismos que regulan la longevidad cronológica en levaduras y del interés de la misma para el uso biotecnológico de las cepas vínicas en los procesos de elaboración del vino, en esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la relevancia de diferentes componentes del complejo SAGA en la longevidad cronológica e identificar las conexiones de dicho complejo con la ruta TOR1/Sch9p, y con la respuesta retrógrada y la actividad mitocondrial.
2. Analizar las conexiones entre las rutas de señalización de nutrientes y otros mecanismos implicados en la longevidad cronológica que gobiernan el envejecimiento celular en la vinificación.
3. Evaluar el impacto del sistema tiorredoxina en el crecimiento y en la longevidad cronológica en condiciones de laboratorio y de vinificación mediante análisis proteómico y/o metabolómico de mutantes en las tiorredoxinas y en la tiorredoxina reductasa citosólicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Cepas de microorganismos

Las cepas vínicas industriales y no vínicas (de laboratorio) de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla M.1.

Tabla M.1. Cepas vínicas industriales y cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9	Mat a, <i>ho::loxP</i>	JM Walker ¹
C9 <i>gcn5</i>	C9 <i>gcn5::KanMX</i>	Helena Orozco
C9 <i>gcn5</i>	C9 <i>gcn5::loxP</i>	Este trabajo
C9 <i>gcn5ald4</i>	C9 <i>gcn5::loxP, ald4::KanMX</i>	Helena Orozco
C9 <i>spt20</i>	C9 <i>spt20::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>spt20</i>	C9 <i>spt20::loxP</i>	“ “
C9 <i>spt20ald4</i>	C9 <i>spt20::loxP, ald4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ubp8</i>	C9 <i>ubp8::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ubp8</i>	C9 <i>ubp8::loxP</i>	“ “
C9 <i>ubp8ald4</i>	C9 <i>ubp8::loxP, ald4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tor1</i>	C9 <i>tor1:: KanMX</i>	Helena Orozco
C9 <i>tor1</i>	C9 <i>tor1::loxP</i>	Este trabajo
C9 <i>sch9</i>	C9 <i>sch9:: KanMX</i>	“ “
C9 <i>sch9</i>	C9 <i>sch9::loxP</i>	“ “
C9 <i>rgm1</i>	C9 <i>rgm1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ald4</i>	C9 <i>ald4::KanMX</i>	Helena Orozco

Tabla M.1. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 <i>spt7</i>	C9 <i>spt7::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>spt7</i>	C9 <i>spt7::loxP</i>	“ “
C9 <i>tor1gcn5</i>	C9 <i>tor1::loxP, gcn5::KanMX</i>	“ “
C9 <i>sch9gcn5</i>	C9 <i>sch9::loxP, gcn5::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn5rgm1</i>	C9 <i>gcn5::loxP, rgm1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>sch9rgm1</i>	C9 <i>sch9::loxP, rgm1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rtg2</i>	C9 <i>rtg2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rtg2</i>	C9 <i>rtg2::loxP</i>	“ “
C9 <i>gcn5rtg2</i>	C9 <i>gcn5::loxP, rtg2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rtg2sch9</i>	C9 <i>rtg2::loxP, sch9::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rtg2tor1</i>	C9 <i>rtg2::loxP, tor1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rdp3</i>	C9 <i>rdp3::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rdp3</i>	C9 <i>rdp3::loxP</i>	“ “
C9 <i>hcm1</i>	C9 <i>hcm1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>hcm1</i>	C9 <i>hcm1::loxP</i>	“ “
C9 <i>mks1</i>	C9 <i>mks1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>mks1</i>	C9 <i>mks1::loxP</i>	“ “
C9 <i>ahp1</i>	C9 <i>ahp1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ahp1</i>	C9 <i>ahp1::loxP</i>	“ “
C9 <i>tsa1</i>	C9 <i>tsa1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1</i>	C9 <i>tsa1::loxP</i>	“ “
C9 <i>tsa2</i>	C9 <i>tsa2::loxP</i>	“ “
C9 <i>tsa2</i>	C9 <i>tsa2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>dot5</i>	C9 <i>dot5::KanMX</i>	“ “

Tabla M.1. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 <i>dot5</i>	C9 <i>dot5::loxP</i>	Este trabajo
C9 <i>gcn2</i>	C9 <i>gcn2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn4</i>	C9 <i>gcn4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn4</i>	C9 <i>gcn4::loxP</i>	“ “
C9 <i>gcn2rtg2</i>	C9 <i>gcn2::loxP, rtg2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2mks1</i>	C9 <i>gcn2::loxP, mks1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2hcm1</i>	C9 <i>gcn2::loxP, hcm1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>P_{MET17}-TSA2</i>	C9 <i>P_{MET17}-TSA2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2tsa1</i>	C9 <i>gcn2::loxP tsa1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2ahp1</i>	C9 <i>gcn2::loxP ahp1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2tsa1 P_{MET17}-TSA2</i>	C9 <i>gcn2::loxP, tsa1::loxP, P_{MET17}-TSA2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>P_{MET17}-GCN4</i>	C9 <i>P_{MET17}-GCN4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>P_{SPI1}-GCN4</i>	C9 <i>P_{SPI1}-GCN4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2dot5</i>	C9 <i>gcn2::loxP, dot5::KanMX</i>	“ “
C9 <i>snf1</i>	C9 <i>snf1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>srx1</i>	C9 <i>srx1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>srx1</i>	C9 <i>srx1::loxP</i>	“ “
C9 <i>srx1gcn2</i>	C9 <i>srx1::loxP, gcn2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2gcn1</i>	C9 <i>gcn2::loxP, gcn1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1gcn4</i>	C9 <i>tsa1::loxP gcn4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1tor1</i>	C9 <i>tsa1::loxP, tor1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1sch9</i>	C9 <i>tsa1::loxP, sch9::KanMX</i>	“ “
C9 <i>hsp104</i>	C9 <i>hsp104::KanMX</i>	“ “
C9 <i>hsp104</i>	C9 <i>hsp104::loxP</i>	“ “

Tabla M.1. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 <i>pde2</i>	C9 <i>pde2::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>pde2</i>	C9 <i>pde2::loxP</i>	“ “
C9 <i>ubr2</i>	C9 <i>ubr2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rpn4</i>	C9 <i>rpn4::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rpn4</i>	C9 <i>rpn4::loxP</i>	“ “
C9 <i>pde2tsa1</i>	C9 <i>pde2::loxP, tsa1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rpn4tsa1</i>	C9 <i>rpn4::loxP, tsa1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ubr2tsa1</i>	C9 <i>ubr2::loxP, tsa1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>pde2gcn2</i>	C9 <i>pde2::loxP, gcn2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rpn4gcn2</i>	C9 <i>rpn4::LoxP, gcn2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ubr2gcn2</i>	C9 <i>ubr2::loxP, gcn2::KanMX</i>	“ “
C9 P _{gk1} -GFP	C9 <i>PGK1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1</i> P _{gk1} -GFP	C9 <i>tsa1::loxP PGK1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2</i> P _{gk1} -GFP	C9 <i>gcn2::loxP, PGK1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1gcn2</i> P _{gk1} -GFP	C9 <i>tsa1::loxP, gcn2::loxP, PGK1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 T _{sa1} -GFP	C9 <i>TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 H _{sp104} -GFP	C9 <i>HSP104-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 P _{ub1} -GFP	C9 <i>PUB1-GFP::KanMX</i>	Helena Orozco
C9 P _{ab1} - GFP	C9 <i>PAB1- GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>tsa1</i> H _{sp104} -GFP	C9 <i>tsa1::loxP, HSP104-GFP::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>hsp104</i> T _{sa1} -GFP	C9 <i>hsp104::loxP, TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2</i> T _{sa1} -GFP	C9 <i>gcn2::loxP, TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn2</i> H _{sp104} -GFP	C9 <i>gcn2::loxP, HSP104-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>srx1</i> T _{sa1} -GFP	C9 <i>srx1 ::loxP, TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “

Tabla M.1. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 <i>srx1</i> Hsp104-GFP	C9 <i>srx1::loxP</i> , <i>HSP104-GFP::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>pde2</i> Tsa1-GFP	C9 <i>pde2::loxP</i> , <i>TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>ubr2</i> Tsa1-GFP	C9 <i>ubr2::loxP</i> , <i>TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>rpn4</i> Tsa1-GFP	C9 <i>rpn4 ::loxP</i> , <i>TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>sod1</i>	C9 <i>sod1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx1</i>	C9 <i>trx1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx1</i>	C9 <i>trx1::loxP</i>	“ “
C9 <i>trx2</i>	C9 <i>trx2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx2</i>	C9 <i>trx2::loxP</i>	“ “
C9 <i>trx1trx2</i>	C9 <i>trx1::loxP</i> , <i>trx2::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1</i>	C9 <i>trr1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1</i>	C9 <i>trr1::loxP</i>	“ “
C9 <i>trx1trx2</i> Sod1-MYC	C9 <i>trx1::loxP</i> , <i>trx2::loxP</i> , <i>SOD1-MYC::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx1trx2</i> Tsa1-GFP	C9 <i>trx1::loxP</i> , <i>trx2::loxP</i> , <i>TSA1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx1trx2</i> Hsp104-GFP	C9 <i>trx1::loxP</i> , <i>trx2::loxP</i> , <i>HSP104-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx1trx2</i> Pab1-GFP	C9 <i>trx1::loxP</i> , <i>trx2::loxP</i> , <i>PAB1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trx1trx2</i> Pub1-GFP	C9 <i>trx1::loxP</i> , <i>trx2::loxP</i> , <i>PUB1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1tsa1</i>	C9 <i>trr1::loxP</i> , <i>tsa1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1sch9</i>	C9 <i>trr1::loxP</i> , <i>sch9::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1tor1</i>	C9 <i>trr1::loxP</i> , <i>tor1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1</i> Pkg1-GFP	C9 <i>trr1 ::loxP</i> , <i>PGK1-GFP::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1sod1</i>	C9 <i>trr1::loxP</i> , <i>sod1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>gtr1</i>	C9 <i>gtr1::KanMX</i>	“ “
C9 <i>trr1</i>	C9 <i>trr1::loxP</i> , <i>gtr1::KanMX</i>	“ “

Tabla M.1. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 tor1-MYC	C9 TOR1-MYC::KanMX	Este trabajo
L2056	Cepa Vínica	Lallemand
L2056 <i>gcn5</i>	L2056 <i>gcn5::loxP</i> , <i>gcn5::KanMX</i>	Este trabajo
L2056 <i>ubp8</i>	L2056 <i>ubp8::loxP</i> , <i>ubp8::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>spt20</i>	L2056 <i>spt20::loxP</i> , <i>spt20::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>spt7</i>	L2056 <i>spt7::loxP</i> , <i>spt7::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>rtg2</i>	L2056 <i>rtg2::loxP</i> , <i>rtg2::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>gcn5rtg2</i>	L2056 <i>gcn5::loxP</i> , <i>gcn5::loxP</i>	“ “
L2056 <i>gcn5rtg2</i>	L2056 <i>gcn5::loxP</i> , <i>gcn5::loxP</i> , <i>rtg2::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>gcn5rtg2</i>	L2056 <i>gcn5::loxP</i> , <i>gcn5::loxP</i> , <i>rtg2::loxP</i>	“ “
L2056 <i>gcn5rtg2</i>	L2056 <i>gcn5::loxP</i> , <i>gcn5::loxP</i> , <i>rtg2::loxP</i> , <i>rtg2::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>rgm1</i>	L2056 <i>rgm1::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>rgm1</i>	L2056 <i>rgm1::loxP</i>	“ “
L2056 <i>rgm1</i>	L2056 <i>rgm1::loxP</i> , <i>rgm1::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>rpd3</i>	L2056 <i>rpd3::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>rpd3</i>	L2056 <i>rpd3::loxP</i>	“ “
L2056 <i>rpd3</i>	L2056 <i>rpd3::loxP</i> , <i>rpd3::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>gcn2</i>	L2056 <i>gcn2::loxP(x3)</i> , <i>gcn2::KanMX</i>	“ “
L2056 <i>gcn4</i>	L2056 <i>gcn4::loxP</i> , <i>gcn4::KanMX</i>	“ “
BY4742	BY4742 Mata <i>his3Δ l1eu2Δlys2Δura3Δ</i>	Brachnan y col
BY4742 <i>dal5</i>	BY4742 <i>dal5::KanMX4</i>	Giaever G y col
BY4742 <i>mep2</i>	BY4742 <i>mep2::KanMX4</i>	Giaever G y col
BY4742 <i>gsh2</i>	BY4742 <i>gsh2::KanMX4</i>	Giaever G y col

Tabla M.1. Continuación.

Cepas	Genotipo	Procedencia
BY4742 <i>tsa1</i>	BY4742 <i>tsa1::NAT1</i>	Giaever G y col
BY4742 <i>gcn2</i>	BY4742 <i>gcn2::KanMX4</i>	Giaever G y col
BY4742 <i>srx1</i>	BY4742 <i>srx1::KanMX4</i>	Giaever G y col
BY4742 <i>C48S tsa1</i>	BY4742 <i>tsa1C48S</i>	Mikael Molin
BY4742 <i>C171S tsa1</i>	BY4742 <i>tsa1C171</i>	Mikael Molin
BY4742 <i>DYF tsa1</i>	BY4742 <i>tsa1DYF</i>	Mikael Molin
BY4742 <i>tsa1gcn2</i>	BY4742 <i>tsa1::Nat1, gcn2::HIS3</i>	Este trabajo
BY4742 <i>tsa1 C48S gcn2</i>	BY4742 <i>tsa1C48S, gcn2::HIS3</i>	“ “
BY4742 <i>tsa1C171S gcn2</i>	BY4742 <i>tsa1C171 gcn2::HIS3</i>	“ “
BY4742 <i>tsa1DYF gcn2</i>	BY4742 <i>tsa1DYF gcn2::HIS3</i>	“ “
BQS252	MAT a, <i>ura3-52</i> Fondo genético FY1679	J. Enrique Pérez-Ortín
BQS252 <i>tsa1</i>	BQS252 <i>tsa1::KanMX</i>	Este trabajo
BQS252 <i>gcn2</i>	BQS252 <i>gcn2::KanMX</i>	“ “
BQS252 <i>tsa1gcn2</i>	BQS252 <i>tsa1::loxP, gcn2::KanMX</i>	“ “
BQS252 <i>trr1</i>	BQS252 <i>trr1::KanMX</i>	“ “

1 Walker, M. E., Gardner, J. M., Vystavelova, A., McBryde, C., de Barros Lopes, M., and Jiraneck, V. (2003 FEMS Yeast Res 4, 339-347

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α ($\sqrt{80d}$, *lac ZAM15 endA1 secA1, hsdR17 supE44 thi-1, Δ -, gyr A relA1, F-*) ha sido empleada para la construcción de los plásmidos necesarios.

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 geneticina <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>	Helena Orozco y col, 2012
pFA6a-13Myc-KanMX6	Plásmido que contiene 13 repeticiones en tándem de la secuencia que codifica para el epítipo Myc	Longtine y col, 1998
pYEp351-cre-cyh	Plásmido que contiene el gen de la recombinasa Cre del fago P1, bajo el control del promotor <i>GAL1</i> , y marcador de resistencia a cicloheximida.	Delneri y col, 2000
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	Plásmido que contiene el gen de la proteína fluorescente GFP para el etiquetado de proteínas en el extremo C terminal. Presenta el marcador de resistencia a geneticina <i>KanMX6</i> .	Bähler y col, 1998
pRS313	Plásmido centromérico que contiene el gen <i>HIS3</i> como marcador de selección.	R. Sikorski y Philip Hieter.
pFA6a-His3MX6	Plásmido para obtención de cassettes de integración con el gen <i>HIS3</i> como marcador de selección	Longtine y col, 1998

1.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR con distintos fines (construcción de diferentes cepas de levaduras vínicas industriales y levaduras de laboratorio, etiquetado de proteínas para marcaje fluorescente (GFP) o para marcaje con el epítipo Myc) fueron diseñados con el programa Gene Runner y fueron sintetizados por las casas comerciales Isogen, Roche e Integrate DNA technologies, según el caso.

Las secuencias, escritas en orientación 5'-3', y su uso se describen en la Tabla M.3. Como norma general los oligonucleótidos marcados como a y b se utilizaron para amplificar el cassette de interrupción, c se sitúa en el promotor, d en la ORF y e en la 3'-UTR.

Tabla M.3. Secuencias de oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
GCN5 a	AAAAGTCTTCAGTAACTCAGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
GCN5b	CTTCGAAAGGAATAGTAGCGGATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
GCN5c	AGGATTGGTAAGGGAAGACC	Comprobación
GCN5d	TTATTGGTCTCAGCCTGCTC	Comprobación
GCN5e	ATTGATCACATCGTCTCGCC	Comprobación
ALD4a	AACCAACCAAGAAAACACTACAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
ALD4b	GTATGTAAGCATCGATTGGACATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
ALD4c	TGAAAATGGAAGTTCGGCG	Comprobación
ALD4d	TAGGCACTGTCATAGGAAG	Comprobación
ALD4e	GCCATCTTTGGTCAAAGGTG	Comprobación
SPT20a	AGGAATAGTTACGGTTAATTTTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SPT20b	TATATATATATATAAGGAATGAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SPT20c	TTAGTTCTGTTACCCGCTCG	Comprobación
SPT20d	TTACATTTGCTACCGCTGGG	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
SPT20e	TTGAGCACAGAGGTGAGATG	Comprobación
UBP8a	CTACTTGAAACCCTGCTTTTTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
UBP8b	CTTTTTGTGTTTATTATTATTTGTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
UBP8c	GCTGTCGTAATAGCAAAGGG	Comprobación
UBP8d	GCAGGTTTTTAGAACCCCATC	Comprobación
UBP8e	CCAGCCTTTGCTCTTTTGTTT	Comprobación
TOR1a	AGTGAAACATACATCAACCGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
TOR1b	AAATAGTAAACAAAGCACGAAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
TOR1c	GGTTCTCGCCATTTTGAAGC	Comprobación
TOR1d	ACCTACTAGAAGTCAGACCG	Comprobación
TOR1e	AGATGAGGACCTCAGTAAGG	Comprobación
TOR1-R1	AAATAGTAAACAAAGCACGAAATGAAAAATGACACCGCAGGAATTCGA GCTCGTTTA	Etiquetado
TOR1-F2	AAGGTTATGTCAACATTATATTGGATGGTGCCATTCTGGCGGATCCCCG GGTTAAT	Etiquetado
SCH9a	ATACTCGTATAAGCAAGAAATTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SCH9b	AAGGAAAAGAAGAGGAAGGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SCH9c	CCCACTCTCACATAATCACC	Comprobación
SCH9d	ATGGGTATCCGTTGTCGTTG	Comprobación
SCH9e	GCGAAGCGTTACTTAAGCC	Comprobación
RGM1a	CGTCTATAGTCCAGGACAATTAGCATGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
RGM1b	TGATGCGGCTTGTGAAATGGAGGAGTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
RGM1c	TTCATTCTCAGCGGATCCC	Comprobación
RGM1d	CATTGGAATGGTTTCTCCCC	Comprobación
RGM1e	GCATTTCCCAACAGAAGCGG	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
SPT7a	TCTTTAAACTGTAACACTACAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SPT7b	TTTAATTAAGATAAAAATATTCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SPT7c	CTTGTTGGGACTAACTCCAG	Comprobación
SPT7d	TTAGTGACGCTACGCTTGTG	Comprobación
SPT7e	CACTTGAAATCGACAGCAGG	Comprobación
RTG2a	ATGTCAACACTTAGCGATAGTGATACCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
RTG2b	TCACATACATAATCGTACCAATATACTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
RTG2c	AGTCACATGACCGCGATAAG	Comprobación
RTG2d	TTCTTGCATGATGTGCAGCC	Comprobación
RTG2e	TAAACTGGTCTCCACCTCAC	Comprobación
RPD3a	CATACAAAACATTCGTGGCTACAACCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
RPD3b	TCACATTATTTATATTCGTATATACTTCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
RPD3c	TATTTACTTACCCTCCCCGG	Comprobación
RPD3d	GACCTGCTCCATATGCATAG	Comprobación
RPD3e	GTTGATGTATGAACGGAACGC	Comprobación
HCM1a	AGCAAAAAAAAAAAAAAAAAATCAACAAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
HCM1b	AGATTAAGAATAATTAGTTTTCGGTGAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
HCM1c	AAGCACCGTGCTATTAACCC	Comprobación
HCM1d	TTTCTCACAGTTGAGCTCGG	Comprobación
HCM1e	ACCATAGAAGAGCGGAAAAG	Comprobación
MSK1a	TTCTTAATTATTCTCTAATCCTAATAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
MKS1b	AGAACTTTAAATACTGTATCTGATTTA	Delección
MKS1c	GCAGTAGGGATCTTTAACCC	Comprobación
MKS1d	TGCTCGACACATTTGGATGC	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
MKS1e	TCATCTCATCGCATTTCCGG	Comprobación
AHP1a	ACCAGAACAACACAAGTACTACCAATAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
AHP1b	TTTTTATATAAACATGGTTTTATTGTCTATATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
AHP1c	TTTCCACACCCCTTCCGGAC	Comprobación
AHP1d	GAGCACCGGTAATGATAACC	Comprobación
AHP1e	TATACGCAGTGCCTCTTAGC	Comprobación
TSA1a	TGCTCACAACCAACCACAACACTACATACACATACATACACATTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Delección
TSA1b	ATTTTAAATAAGTAGTCATTTAGACAACCTCTGCAAGCGTCATAGGCCACT AGTGGATCTG	Delección
TSA1c	AAAGTCGGCTGGCAACAAAC	Comprobación
TSA1d	GGCTAGGACAACGTACTIONTAC	Comprobación
TSA1e	TGGCAGTGAATGGTTTACGC	Comprobación
TSA1-R1	TGAGCTAGTGTGAATAGCTTCTTAGACGGTAGTGTATCGCGTTAGTATCG AATCGACAGC	Etiquetado
TSA1-F2	TGCTCACAACCAACCACAACACTACATACACATACATACACACGGATCCCCG GGTTAAT	Etiquetado
TSA2a	CAAGAATATATTAGCCTTACAAGAACGTAAAAACCAATCTTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Delección
TSA2b	TTTTAATTATTTAATAGGGCCTAGCGTTATCGTGCGAAGAATAGGCCACT AGTCGATCTG	Delección
TSA2c	GCTAAGGTGTTTGTACCCG	Comprobación
TSA2d	CGCAACAATCTCAGTTGGAC	Comprobación
TSA2e	CGAAAACAAACCTGCATGGG	Comprobación
TSA2f	GTTAGTAAGCGCTACGACGACTAGAACCATCTCTTGAATTTTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
TSA2g	TCTTAAATGGTGGGGCTTGTTTTTGAACCTCTGCTACCATTGTATGGATG GGGGTAATAG	Sobreexpresión con <i>MET17</i>

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
DOT5a	TACGAGCTTTATACAGGTAATATTAAGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
DOT5b	AAGTACTCCTCTAGAGAAACAAAAGGGATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
DOT5c	AGGAATGTTTCGAGCAAGAGC	Comprobación
DOT5d	ACTTCCGGTGTGCAAATAGG	Comprobación
DOT5e	TTATGACCTTCTGCAGGCTC	Comprobación
GCN2a	TCAATAATTTTCCGTTCCCCTTAACACTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
GCN2b	TTAACTGATGCGTTATAGCGCCGCACAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
GCN2c	TTACATTGTTGGAAAGCCTCG	Comprobación
GCN2d	GCTGCTTATCCCAGCTAGAC	Comprobación
GCN2e	TAAGAAAGGTGACCTACCCC	Comprobación
GCN4a	CAATTTGTCTGCTCAAGAAAATAAATTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
GCN4b	GAGAATGAAATAAAAAATATAAAATAAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
GCN4c	CCAATTGCTATCATGTACCCG	Comprobación
GCN4d	TGGTTTGGCAGTAGAAGTGG	Comprobación
GCN4e	CGGCAGATTATAAATGCGTGG	Comprobación
GCN4f	GGCTCGCTGTCTTACCTTTTAAAATCTTCTACTTCTTGACTTCGTACGCTGCAGGT CGAC	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
GCN4g	TTGGATTTAAAGCAAATAAACTTGGCTGATATTCGGACATTGTATGGATGGGGG TAATAG	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
MET17c	CCTTGTCCAATTGAACACGC	Comprobación
SNF1a	TTTGTAACAAGTTTTGCTACACTCCCTTATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SNF1b	AAAAAAGGGAACTTCCATATCATTCTTTTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SNF1c	TCTTACTGCGCATTTCGTGTC	Comprobación
SNF1d	CTTGGGATTGTTTAGCGTGC	Comprobación
SNF1e	GCCACTAGTAGTACTCATCTC	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
SRX1a	TGAAAAAAAAAACTACAAAACCAAGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SRX1b	ATTTATCTATGTTTCTTATGTAGTGTTAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SRX1c	AATATGCCGTTACCCGTTGC	Comprobación
SRX1d	TCTTGCTAGCGGTGGGAATG	Comprobación
SRX1e	CACAACTGCTAGTGCCTAC	Comprobación
HSP104a	AAAAGAAATCAACTACACGTACCATAAAATATACAGAATATTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Delección
HSP104b	TGATTCTTGTTGAAAGTTTTTAAAAATCACACTATATTAATAGGCCACTA GTGGATCTG	Delección
HSP104c	CAGTAAAAGGCAAAGGGGCG	Comprobación
HSP104d	GATGTTGATGATCCGAAGCC	Comprobación
HSP104e	TTTGCTCGGGTGTCAAGTTC	Comprobación
HSP104-R1	ATTCTTGTTGAAAGTTTTTAAAAATCAC	Etiquetado
HSP104-F2	CGATAATGAGGACAGTATGGAAATTGAT	Etiquetado
PDE2a	GATCACTACTACTTAATTGAAGAAAACATAACCTAT TGATTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
PDE2b	GTTTATACAATGAATGGTACAAGAAATTTTGATATTCTTGATAGGCCACT AGTGGATCTG	Delección
PDE2c	GTCACTGTGAGAGATTGGAC	Comprobación
PDE2d	GAAAAGGCGAAACTCTGTCC	Comprobación
PDE2e	CAATAGCCATAATCAACTGGG	Comprobación
UBR2a	TAAGTGGACTCCAGGTGCTGCTACCATCAAGCCAACCGTTTTTCGTACGCT GCAGGTC	Delección
UBR2b	ATCTGTTTTAATTGGCGTGGGGAAGTGGGGTAGGGTCGAGATAGGCCAC TAGTGGAT	Delección
UBR2c	CAATGTACAGCTGTGGGGAG	Comprobación
UBR2d	ATTTGCGGAGTTTGGGGAGC	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
UBR2e	CCGTCCCTGTCCCTTCCCAC	Comprobación
RPN4a	TTGTATCTTTTCAAAGTTTTCTAGAATTTTCAAGCAATCTTCGTACGCTG CAGGTCGAC	Delección
RPN4b	GGTTTTCTTCTTTTATCTCCTATATAATTTGTAACCTTAAATAGGCCACTAG TGGATCTG	Delección
RPN4c	CTTTTTCTTCTTGCGTGG	Comprobación
RPN4d	GTAAACTGACTGTGACCTGG	Comprobación
RPN4e	AATGGTATCCCCTTAGTCGT	Comprobación
PGK1-R1	AAAGAAAAAATTGATCTATCGATTTCAATTCAATTCAATGAATTCGAGC TCGTTTAA	Etiquetado
PGK1-F2	TAAGGAATTGCCAGGTGTTGCTTTCTTATCCGAAAAGAAACGGATCCCCG GGTTAAT	Etiquetado
PGK1e	CTGCATAAAGGCATTAAG	Comprobación
PAB1- R1	TAAGTTTGTTGAGTAGGGAAGTAGGTG	Etiquetado
PAB1-F2	GTCTTTCAAAGGAGCAAGAACAAC	Etiquetado
PAB1e	TGCGGTGATGAATAGCAAGG	Comprobación
PUB1-R1	GTCGTTCTTTTTTATTTTATCT	Etiquetado
PUB1-F2	TGAGCAACAACAGCAACAGCA	Etiquetado
PUB1e	CATGTCTCCATAACGCTAGG	Comprobación
SOD1a	ATGCGAAATTGGACGTAAGTATCTCTGAAGTGCAGCCGA	Delección
SOD1b	CGAGACGGGCCAGCGTTGCGAAATATTCGAATTGAAAGGCCACTAGTGG ATCTG	Delección
SOD1c	CGTTTTCGTTAAGCAATCTC	Comprobación
SOD1d	GATTCGGAAGCCTGTTGAA	Comprobación
SOD1e	CATCGTCATCGCTATGAGAT	Comprobación
SOD1-R1	ACTTACATACGGTTTTTATTCAAGTATATTATCATTAAC	Etiquetado
SOD1-F2	CGGTCCAAGACCAGCCTGTGGTGTGATTGGTCTAACCAA	Etiquetado

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
TRX1a	GAAGACTAGACACCTCGATACAAATAATGGTACTC	Delección
TRX1b	GGCTTAAGTCTGGGTCCGCTTCTTTACAAATTTGGA	Delección
TRX1c	AATGGCTTAAGTCTGGGTCC	Comprobación
TRX1d	AAGCAAAGTTGGCATAGCGG	Comprobación
TRX1e	TTCTCCACCTCCTTTGTGTG	Comprobación
TRX2a	ATGGTCACTCAATTAATAATCCGCTTCTGAATACGAC	Delección
TRX2b	ACTGGTAAACATGATGTACTTTACGTAGCGTTAATA	Delección
TRX2c	ATAAGAAAGCCATTCGGGGG	Comprobación
TRX2d	AAATCCGCTTCTGAATAC	Comprobación
TRX2e	CAAGCCAAAGGTGCAGAAAG	Comprobación
TRR1a	AATAGCGAACAGTACGAAAGTAAACATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
TRR1b	CAAAAATTTGAGTGTATCTATTTTATAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
TRR1c	ATAAGAGTGGACCCAACTGC	Comprobación
TRR1d	AGATTATAGCGTCAGTCGTC	Comprobación
TRR1e	GATGGCCTATGTCATGTGTC	Comprobación
GTR1a	AAGGCCATCAAATCACGTTTATCAATCGACAATTTAGTATTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Delección
GTR1b	CAAACACTCAATTGCCGAATGTTTCGTCTACTCACCTCAGATAGGCCACT AGTGGATCTG	Delección
GTR1c	CACTCTCGCATTCTGTCTAC	Comprobación
GTR1d	AAATTTTGGCGTCGGGAGAG	Comprobación
GTR1e	AACCCGACAAGATTGGTTG	Comprobación
K2	GGGACAATTCAACGCGTCTG	Comprobación
K3	CCTCGACATCATCTGCCAG	Comprobación

Tabla M.4 Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de QRT-PCR. Se muestran dos pares de oligos para cada gen de estudio. Como Fw “Forward” y Rev “Reverse” para los oligonucleótidos de amplificación del gen.

Oligonucleótido	Secuencia(5´-3´)	Gen
DAL5_Fw1	GTCTTGGCTCCATCCTGATCA	<i>DAL5</i>
DAL5_Rev1	CGTCAGGGATCCACAGGAAT	<i>DAL5</i>
DAL5_Fw2	CTTACCTGTGGTACATCTCGC	<i>DAL5</i>
DAL5_Rev2	TAAGGTTTGTGGTCCTGCC	<i>DAL5</i>
MEP2_Fw1	CGAGGGTTGGTTGGTCAAAT	<i>MEP2</i>
MEP2_Rev1	GGTTTGTACTTGGGCATCCC	<i>MEP2</i>
MEP2_Fw2	G TTCAGGTATCATCGCTGGC	<i>MEP2</i>
MEP2_Rev2	CTAGACCATCATCGATGCGC	<i>MEP2</i>
GDH2_Fw1	AAGGAACTGCTGGTTTCGTG	<i>GDH2</i>
GDH 2_Rev1	AAGCACGAACACCCAGAGAA	<i>GDH2</i>
GDH 2_Fw2	ACTGCTGGTTTCGTGGATTG	<i>GDH2</i>
GDH 2_Rev2	AACATAAGCACGAACACCCA	<i>GDH2</i>

2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

2.1 Bacterias

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron en medio LB (extracto de levadura 0.5% (p/v), bactotripton 1.0 % (p/v), NaCl 1.0% (p/v)). Para el cultivo de cepas con plásmido se añadió ampicilina (50mg/mL) al medio, como factor de selección. El crecimiento se realizó a 37 °C en agitación (200 rpm). Para los cultivos en placa el medio fue suplementado con agar bacteriológico 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 y Kaiser (Adams and Kaiser, 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, añadiéndoles a estos últimos agar bacteriológico al 2% (p/v).

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 YPD, galactosa en YPGal, glicerol en YPG, etanol en YPE o glucosa 10% (p/v) más fructosa 10% (p/v) en YPGF para los ensayos de capacidad fermentativa. Para la selección de transformantes en transformaciones de levaduras con marcador de selección Kan^R, el medio YPD se suplementó con geneticina 200mg/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 describe (Adams and Kaiser, 1998). SC N 1/25 es como el SC con 25 veces menos de fuente de nitrógeno (sulfato de amonio y aminoácidos).

El medio mínimo (SD) es una variante del medio SC, pero 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), y no contiene sulfato amónico. El SD sin glucosa (SD-G) contiene solamente base nitrogenada para la levadura sin aminoácidos (YNB) 0.17% (p/v) y sulfato amónico 0.5% (p/v), y no contiene glucosa.

En los casos en los que la cepa albergaba auxotrofías, los requerimientos necesarios fueron añadidos a una concentración final de 20mg/L para histidina, metionina y uracilo, 100mg/L para leucina y 30mg/L para lisina. Para la selección de transformantes en transformaciones de levaduras con marcador de selección *cyh*, el medio SD se suplementó con cicloheximida 1mg/mL.

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 Tempranillo, cedido por bodegas J. Belda (Fontanars dels Alforins, España), suplementado con 10g/HL de metabisulfito potásico y parcialmente clarificado por sedimentación durante 1-2 días a 10 °C. Este mosto fue congelado inmediatamente hasta su utilización.

Tras su descongelación a 4°C y con el fin de prevenir el crecimiento de otros microorganismos, el mosto se desinfectó con dimetil dicarbonato (DMDC) 500µg/L, dejando actuar durante 24 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. Se midieron los azúcares y, en ocasiones, el nitrógeno asimilable en el mosto antes de inocular la levadura.

El mosto sintético MS300 (Riou et al., 1997) se compone de glucosa 100g/L, fructosa 100g/L, ácido málico 6g/L, ácido cítrico 6g/L, KH₂PO₄ 0.75g/L, K₂SO₄ 0.5g/L, MgSO₄.7H₂O 0.25g/L, CaCl₂.2H₂O 0.155g/L, NaCl 0.2g/L. Como fuente de nitrógeno se añade NH₄Cl 0.46g/L y una mezcla que contiene los 20 aminoácidos. Dichas cantidades de fuentes de nitrógeno se dividieron a la cuarta parte para obtener el mosto con menor cantidad de nitrógeno, MS75.

También contiene oligoelementos 1mL/L (de una solución formada por MnSO₄.H₂O 4g/L, ZnSO₄.7H₂O 4g/L, CuSO₄.5H₂O 1g/L, CoCl₂.6H₂O 0.4g/L, H₃BO₃ 1g/L y (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1g/L), vitaminas 10mL/L (de una solución formada por mioinositol 2g/L, pantotenato de calcio 0.15g/L, hidrocloreto de tiamina 0.025g/L, ácido nicotínico 0.79mg/L, piridoxina 0.025g/L y biotina 0.3mg/L) y factores anaerobios 1mL/L (de una solución formada por ergosterol 1.5mL/100mL de etanol puro y Tween 20 (1:1) y ácido oleico 0.5mL/100mL 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 24 °C en agitación muy suave (50 rpm) en tubos cónicos de centrifuga desechables de 30 o de 50 mL, dependiendo del volumen necesario para cada experimento. El crecimiento del cultivo se siguió mediante el recuento de células viables en placas de YPD, tras efectuar la correspondiente dilución en agua con el fin de sembrar entre 200 y 500 colonias por placa.

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 and Longo, 2003b). Para ello se inocularon, a una D.O₆₀₀ de 0.1, 30mL de medio SC con células procedentes de un precultivo en medio YPD crecidas hasta saturación durante 24 horas. Las cinéticas de envejecimiento se realizaron en un agitador orbital a 200 rpm a 30°C. Esto cultivos se dejaron crecer durante 3 días tomando la viabilidad de este punto como el 100% de viabilidad (t₀). En el caso de envejecimiento en SC N 1/25 los cultivos se dejaron crecer durante 7 días tomando la viabilidad de ese punto como el 100% de viabilidad (t₀).

La viabilidad se midió mediante recuento de unidades formadoras de colonia en placa de YPD, tras efectuar la correspondiente dilución en agua. Posteriormente se fueron tomando muestras a distintos tiempos, procediendo de la misma manera, tomando el t₀ como el 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 macroautofagia recogidos en el Capítulo 1 se realizaron según lo descrito para detectar la degradación de la aldehído deshidrogenasa Ald6p, como marcador de dicho proceso (Onodera and Ohsumi, 2004). Para ello se inocularon células procedentes de un precultivo de toda la noche en medio YPD en 200mL de YPD fresco a D.O₆₀₀ de 0.1 y se dejaron crecer hasta una D.O₆₀₀ de 1. Entonces, las células se recogieron por centrifugación, se realizó un lavado en NaCl 0.9% y se resuspendieron en 20 mL de SD-N. Posteriormente se tomaron alícuotas de 3 mL a distintos tiempos, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron en NaCl 0.9% y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Los experimentos de macroautofagia recogidos en los Capítulos 2 y 3 se realizaron según lo descrito para seguir la autofagia de la proteína de fusión fosfoglicerato quinasa-GFP (Pgc1-GFP), como marcador de dicho proceso (Welter et al., 2015). Para ello se inocularon células procedentes de un precultivo de toda la noche en medio YPD en 100 mL de medio mínimo SD a D.O₆₀₀ de 0.1 y se dejaron crecer hasta una D.O₆₀₀ de 1. Se repartió el cultivo en dos tubos cónicos de 50mL, se recogieron las células por centrifugación, se realizó un lavado en NaCl 0.9% y una mitad de las células se guardó a -80°C para su posterior uso, mientras que la otra mitad se resuspendió en 50 mL de medio SD-N, se incubó durante 4h a 30 °C y se recogió por centrifugación. Se ls células lavaron en NaCl 0.9% y se guardaron a -80°C hasta su uso.

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 y con diferentes agentes causantes de estrés, que se detallan a continuación.

2.2.5.1 Formas de crecimiento

2.2.5.1.1 Goteos en placa

Para analizar la viabilidad de cada una de las cepas estudiadas se tomó una alícuota del cultivo procedente de un precultivo de toda la noche en medio YPD y se ajustó su volumen con agua destilada estéril hasta una D.O₆₀₀ de 1. A partir de ésta, se realizaron diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ 10⁻⁴ y 10⁻⁵. Sobre las placas de medio rico YPD o de medio mínimo SD, con los diferentes agentes causantes de estrés, se depositaron gotas de 5µL de cada una de las diluciones y se incubaron a 30°C durante 2 días.

2.2.5.1.2 Halos de inhibición

Para todas las cepas analizadas, se midió el halo de inhibición de crecimiento de cultivos de 12h de crecimiento en medio YPD líquido, producido por la aplicación de 10 µL del agente causante de estrés sobre un disco de 0.5 cm de diámetro de papel de filtro colocado en el

centro de una placa Petri sembrada en césped con el cultivo.

2.2.5.1.3 Cultivo líquido

Para estudiar la respuesta a estrés en fase de crecimiento exponencial, las diferentes cepas se precultivaron durante toda la noche en medio YPD y se inocularon en el medio de crecimiento de interés (YPD, SC o SD) a una $D.O_{600}$ de 0.1 y se dejaron crecer hasta una $D.O_{600}$ de 0.6-0.7. Se añadió el agente de estrés de estudio y se dejaron crecer el tiempo necesario para observar la respuesta de cada agente de estrés, en agitación a 30 °C. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con 0.9% de NaCl y se guardaron a -80°C para su posterior utilización.

2.2.5.2 Agentes causantes de estrés

2.2.5.2.1 Estrés oxidativo

Por goteo en placa de YPD con peróxido de hidrógeno H_2O_2 (de 1 a 4 mM), hidroperóxido de terc-butilo 1mM, diamida 1mM, 1,4 Ditiotitol (DTT) 1mM.

Mediante halo de inhibición de crecimiento producido por la aplicación de 10 μ L menadiona al 0.5M, 10 μ L de diamida al 2M o de 10 μ L de H_2O_2 al 30%.

Mediante cultivo en líquido de YPD con 0.5-0.6 mM de peróxido de hidrógeno H_2O_2 .

2.2.5.2.2 Estrés por temperatura

Por goteo en placa de YPD e incubadas a 42 °C durante 2 días para estudiar la resistencia al estrés térmico y a 12°C durante 6 días para estudiar el estrés por frío.

2.2.5.2.3 Estrés por Etanol

Por goteo en placa de YPD con EtOH 5 (v/v), 10% (v/v) y 12 % (v/v) e incubadas a 30°C durante 2-3 días.

2.2.5.2.4 Estrés por parada en la traducción

Crecimiento en líquido, 2h tras la adición de 5mM de AZC (acetidina-2-ácido carboxílico), compuesto análogo de la prolina que promueve agregación de proteínas, en fase exponencial .

Mediante halo de inhibición de crecimiento producido por la aplicación de 10 μ L de cicloheximida 1 μ g/ μ L (concentración final 1mM).

2.2.5.2.5 Estrés por ayuno de nitrógeno

Por goteos en placa de medio SD y/o YPD con Rapamicina 100mM, L-metionina-S-sulfoximina (MSX) 100mM y Sulfumeturón metil (SM) 1 μ g/ μ L.

Por goteos en placa de medio SD con 3-amino-1, 2,4-triazol (3AT) 10mM.

Mediante cultivo en líquido en medio SD con Rapamicina 200 ng/mL, con MSX 2 mM y con 10mM de 3AT durante 30 minutos.

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 (GeneJET Plasmid MidiPrep Kit de Thermo Scientific) basado en la lisis alcalina (Sambrook, J. and 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 el análisis por PCR (Hoffman and Winston, 1987), con ligeras modificaciones. Se llevó a cabo a partir de precultivos de 5 mL cultivados a saturación en medio YPD. Las células se rompieron en tampón de lisis (Triton X-100 2% (p/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM) con un volumen de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y un volumen de perlas de vidrio. La rotura se realizó 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.

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. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25µL o 100 µL, según fuera la PCR analítica o preparativa, con 3.0 ng/ µL de DNA molde genómico o 0.4 ng/ µL de DNA plasmídico, 1.0 pmol/ µL de cada cebador, dNTPs 0.25mM, 1.0 U de polimerasa BioTaq (Bio-21040, Boline) o Taq-DNA polimerasa (Clean-up) de UVAT-Bio, Tampón suministrado por la casa comercial con MgCl₂ (Tween-20 0.01% (p/v), (NH)₂SO₄ 16 mM, Tris-Hcl 67 mM pH 8.8) y (500mM KCl, 100mM Tris-Cl (pH 8.5 a 25°C), 1% Tritón X-100, 15mM MgCl₂). 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 temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo variable (1 min por cada kb) a 72°C y finalmente un ciclo de 10 min a 72°C.

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

3.3 Obtención de RNA total de levadura

Las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas en agua y congeladas a -80°C , se resuspendieron en 0.5 mL de tampón TES (Tris-HCL 10mM 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 de 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 una mezcla de fenol:cloroformo (5:1) y se volvió a centrifugar. Se realizó una última extracción con una mezcla de 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 -80°C toda la noche. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en agua libre de RNAasas. La concentración de RNA se determinó mediante el aparato espectrofotométrico NanoDrop (Thermo Scientific).

3.4 Transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) en dos pasos

Este protocolo se realizó en el laboratorio de Thomas Nyström y Mikael Molin en Gotemburgo en una estancia de 4 meses. En la estrategia en dos pasos, se obtuvo primero el cDNA con el kit comercial QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) por retrotranscripción al azar a partir de 1 μg de RNA total, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de cDNA se valoró mediante NanoDrop.

En segundo lugar se realizó la PCR en tiempo real utilizando un aparato LightCycler® 2.0 de Roche y usando como sonda fluorescente SYBR Green. Para la obtención y marcaje de los amplificadores se utilizó el kit comercial LightCycler® FastStartDNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. Las características de los oligonucleótidos utilizados se resumen en la tabla M.4.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μL . El protocolo de amplificación utilizado se diseñó siguiendo las indicaciones del kit de marcaje y del fabricante del aparato: 10 min de desnaturalización previa a 95°C ; 40 ciclos de 10 s de desnaturalización a 95°C , 5 s de apareamiento a 55°C y 6 s de extensión a 72°C ; 1 ciclo para obtener curvas de fusión, 10 s a 95°C , 15 s a 65°C y 0 s a 95°C con una rampa de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$; finalmente, una etapa de enfriamiento de 30 s a 40°C . Para la cuantificación y comprobación de la eficiencia de la amplificación, se realizaron rectas de calibrado para cada gen analizado a partir de diluciones seriadas de una mezcla de 6 muestras de cDNA representativas del proceso estudiado con mutantes de cada uno de los genes (*DAL5*, *MEP2* y *GDH2*) y con las condiciones de crecimiento de estudio (ayuno de nitrógeno). Para la normalización se utilizó el transcrito del gen de la actina, *ACT1*, ya que presentaba una expresión estable durante el proceso estudiado.

3.5 Análisis de Polisomas

El análisis de polisomas se realizó durante una estancia de 4 meses en la Universidad de Gotemburgo bajo la dirección de Mikael Molin y Thomas Nyström. Se recogieron 80 mL de cultivo a una $D.O_{600}$ entre 0.4-1 (depende del experimento a realizar) en 2 tubos cónicos de 50mL repartiendo 40mL en cada uno de estos tubos previamente enfriados en hielo y con 400 μ L de cicloheximida (10g/mL). Se centrifugaron a unas 4400 rpm (según la centrifuga usada) 4 min a 4°C. Se resuspendió el sedimento en 2 mL de tampón de lisis (20mM Tris-HCl pH8, 140mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mg/mL cicloheximida, 0.5 mg/mL heparina, 1% Triton X-100) ,1 mL por tubo combinándose los dos en el mismo tubo. Se realizaron al menos dos lavados con tampón de lisis, centrifugando a 4400rpm. Se resuspendió el sedimento final en 700 μ L de tampón de lisis y se rompieron las células en un tubo con perlas de vidrio a 4°C en un aparato FastPrep®-24, 8 veces de 30 s, con 30 s de incubación en hielo entre periodos de rotura. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf que se centrifugó de nuevo a 8000 rpm durante 5 min a 4°C, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo. Se midió la A_{260} y la A_{280} (el ratio debe ser 2:1). Se le añadió glicerol hasta una concentración final de 5%, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C. Para la preparación de 6 gradientes se utilizan 50mL de sacarosa 10% (solución A) y 50mL de sacarosa 50% (solución B). La composición de los gradientes es: 20mM Tris-HCl pH8, 140mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 0.1 mg/mL CHX, 10% sacarosa en la solución A y 50% en la B. Se ponen la solución A y la solución B en el fraccionador de polisomas y se obtienen los 6 gradientes en tubos de centrifuga que se guardan a 4°C hasta su uso.

Se añade la muestra a los tubos con los gradientes de sacarosa ($mL = 10/A_{260}$) y se equilibra la ultracentrífuga (máximo 0.02g de diferencia entre muestras). Se centrifugan las muestras a 35000rpm durante 2h 40 min a 4°C. Las muestras se mantienen en hielo hasta que son escaneadas por el fraccionador. Se utiliza una disolución de sacarosa 60% como solución de bombeo o (“pump solution”) para obtener el perfil de polisomas.

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 a 12000 rpm a 4 °C durante 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 bovina (BSA)

4.1.1 Preparación de extractos para cuantificación de proteína mediante *Western blot*

Tanto para estudiar el nivel de fosforilación (pS52-eIF2- α , pS232/S233-Rps6p) como para estudiar el nivel de expresión de proteínas (autofagia Ald6p, autofagia Pgc1p-GFP, eIF2- α , Rps6p) se recogieron células a distintos tiempos por centrifugación, se lavaron con NaCl 0.9% y se congelaron a -80°C hasta su utilización. Las proteínas se extrajeron en 500 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 5 M, MgCl₂ 1 M, NP40 10% (v/v), PMSF 0.1M y una tableta por cada 10mL de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (complete Mini, EDTA-free de Roche). Si estudiamos niveles de fosforilación de una proteína, se utilizan tres inhibidores de fosfatasa, β glicerolfosfato 1M, NaOrtovanadato 0.5 M y NaF 1,5 M. Tras centrifugar las muestras y cuantificar la concentración de proteína se añadió tampón de carga de proteínas 4X (Tris-HCl 240mM 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°C durante 5 min y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Para estudiar el nivel de sulfonilación de la proteína Tsa1p (Prx-SO₃), así como el nivel de proteína Tsa1p, las células obtenidas a distintos tiempos se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se congelaron a -80°C hasta su uso. Las proteínas se extrajeron con 100 μ L de tampón de lisis (v/2 4M NaOH, β -mercaptoetanol 10% (v/v), agua), se incubó 2 min a temperatura ambiente, se añadió 100 μ L de 50% TCA, se rompieron las células por agitación en vórtex y se centrifugaron a 4°C durante 4 min. El sedimento se lavó con 1M de Tris-HCl pH 7.5. Se centrifugó y se añadió tampón de lisis (10% SDS, 0.5M EDTA, 1M Tris-HCl pH 8, DTT 1M, mezcla comercial de inhibidores de proteasas (complete Mini, EDTA-free de Roche)), se le añadió el tampón de carga de proteínas 4X y se desnaturalizaron las muestras a 100°C durante 5 min. Se guardaron las muestras a -20°C hasta su utilización.

4.1.2 Preparación de extractos proteicos para el estudio del proteoma redox tiólico

Se inocularon las cepas C9 y C9 *trx1 Δ trx2 Δ* en el medio de cultivo de interés a partir de un precultivo de toda la noche en medio YPD. Se inocularon en diferentes medios de crecimiento, YPD, SC y MS300. Se recogieron las células en fase exponencial en el caso del crecimiento en medios YPD y SC, y en fase estacionaria en medio SC midiendo la DO₆₀₀ de los cultivos, y a día 3 de crecimiento en medio MS300 para la cepa silvestre y a día 6 para la cepa doble mutante. Se recogieron por centrifugación a 6000xg a 4 °C durante 5 min. Se lavaron las células dos veces con tampón bicarbonato 50mM conteniendo 50 mM de N-etilmaleimida, d(O)NEM, para alquilar las Cys con su grupo sulfidril reducido, y finalmente se resuspendió el sedimento en la misma disolución con 0.1% de CHAPS. Se rompieron las células con un aparato por homogenización criogénica con nitrógeno líquido.

Se midió la concentración de proteína mediante Bradford (BioRad) usando una recta patrón de BSA, se ajustó en la columna una concentración de alrededor 15 μ g/ μ L y se pasó un volumen final de 130 μ L. Se pasó por la columna Zeba (Thermo- Fisher Scientific) para eliminar el exceso de NEM, previo lavado de la columna con tampón bicarbonato. Se centrifugó 2 min a 1500xg y se recogió el sobrenadante.

Se tomaron unos 100 µg de proteína en un volumen final de 160 µL, se añadió 10 µL de RapiGest al 1% en 25 mM de bicarbonato amónico, se calentó a 80 °C durante 10 min y se agitó durante 5 min. Se añadió 10 µL de una solución 100mM de Tris-2-carboxietilfosfina (TCEP) para reducir los grupos tiol que estuvieran reversiblemente oxidados, se incubó durante 10 min a 60 °C y se centrifugó a 12000 g durante 2 min. A continuación se añadió 10 µL de 200mM N-Etil-d5-maleimida, d(5)NEM, 10 mM concentración final) para alquilar estas cisteínas con una versión del reactivo NEM marcada con 5 átomos de deuterio y se incubó 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. De este paso se reservó 10 µL para el control de calidad mediante SDS-PAGE (McDonagh et al., 2014).

La digestión se llevó a cabo por adición de 10 µL de tripsina a 12.5 ng/µL en 25mM bicarbonato amónico (relación final 50:1 proteína: tripsina) y se incubó toda la noche (alrededor de 14h) a 37 °C. Se tomó una alícuota para el control de calidad y seguidamente se detuvo la digestión por adición de 3µL de ácido trifluoroacético (TFA, 1.5 % concentración final) y se incubó durante 30- 45 min a 35 °C. Se eliminó la parte insoluble por centrifugación a 13000xg 15 min. Se recogió el sobrenadante reservando 10 µL de éste para el control de calidad.

4.2 Co-Inmunoprecipitación de proteínas

Se inocularon las células en el medio de cultivo de interés a partir de un precultivo de toda la noche en medio YPD, a una D_{600} de 0.2. Se recogieron las células en el estado de crecimiento de interés (exponencial o estacionario) por centrifugación a 4200 rpm durante 2 min. Las células se lavaron con agua destilada estéril fría y se volvieron a lavar con el tampón de lisis (50mM Tris Hcl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 5mM $MgCl_2$, inhibidores de proteasas). Se resuspendió en 500 µL de tampón de lisis y se pasaron a tubos con perlas de vidrio. Se rompieron las células con un aparato FastPrep®-24 realizando 3 pulsos de 30 s a una velocidad de 5 m/s, dejando en reposo en frío entre pulsos. Se centrifugaron las células a 12000 rpm durante 15 min a 4°C para clarificar el extracto. Se tomó una alícuota del extracto total (INPUT) y se añadió tampón de carga 4X (sin β-mercaptoetanol) se hirvió a 100 °C durante 5 min y se congeló a -20°C hasta su uso. Se eliminó el resto de sobrenadante. Se tomaron unos 400µL del extracto total y se añadieron 30 µL de las perlas anti-c-myc agarose affinity gel antibody (SIGMA) lavadas varias veces previamente con tampón de lisis. Se incubaron las muestras toda la noche a 4°C en el agitador orbital.

Se centrifugaron las muestras a 1000xg durante 1 min. Se recogió una alícuota del sobrenadante (FRACCIÓN NO RETENIDA) y se le añadió *loading buffer* 4X (sin β-mercaptoetanol) se hirvió a 100 °C durante 5 min y se congeló a -20°C hasta su uso. Se eliminó el resto de sobrenadante.

Se lavaron 3 veces las perlas con 200 µL de tampón de lisis y se centrifugaron a 5000xg por 30 s, retirando el sobrenadante. Se le añadió tampón de carga 4X (sin β-mercaptoetanol) se hirvió a 100 °C durante 5 min y se congeló a -20°C hasta su uso (FRACCIÓN INMUNOPRECIPITADA).

4.3 Proteoma tiol redox

Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida y espectroscopía de masas. **LC-MS/MS**: Los análisis proteómicos se llevaron a cabo en colaboración con el Dr J A Barcena, en la Unidad de Proteómica (SCAI) de la Universidad de Córdoba usando un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) equipado con un cromatógrafo nano-UHPLC Ultimate 3000 (Dionex-Thermo Scientific). Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua ultrapura; fase móvil B: 80% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico. Se realizó un gradiente cromatográfico en una columna C18 nano-capilar (Acclaim PepMap C18, diametro interno 75 μm , tamaño de partícula 3 μm , Dionex-Thermo Scientific) de la siguiente forma: 5 min, 4% B; 185 min, 4-35% B; 10 min 35-80% B; 10 min 80% B; 10 min 4% B. El voltaje del nano-spray se ajustó a 1300 V y el voltaje del capilar a 50 V y 190 °C.

El LTQ Orbitrap operó en modo paralelo, permitiendo una medida precisa de los iones parentales (400-1500 m/z) con una resolución de 30000 de anchura a mitad de altura (full width at half maximum, fwhm) para picos de relación m/z 400, y un análisis en tándem de los mismos en la trampa iónica lineal (LIT), con adquisición de los 5 scans principales de secuencias de péptidos, trabajando en modo DDA (“data-dependent acquisition mode”) que permite la selección de los iones peptídicos más abundantes del espectro completo para su posterior fragmentación y análisis de secuencia. Los tiempos de inyección máximos para MS y MS/MS fueron 500 ms y 50 ms, respectivamente. La anchura para aislamiento de precursor fue de 3 uma y la anchura de exclusión de masa se ajustó a 5 ppm. Se asumió la selección de precursores monoisotópicos excluyendo las especies con carga +1 y se usaron unas energías de colisión normalizadas de 35% para CID (“collision induced dissociation”). El umbral de intensidad mínimo para MS/MS fue 1000 cuentas. Los espectros MS/MS se analizaron con el motor de búsqueda SEQUEST frente a la base de datos Uniprot de *S. cerevisiae* (www.uniprot.org). Los péptidos para el análisis MS se generaron por digestión triptica estandarizada para no permitir digestiones incompletas con más de un punto de corte no realizado, e incluyendo tratamientos con NEM y d(5)NEM y de oxidación de Met, como modificaciones variables. Los cálculos estadísticos se realizaron con el algoritmo Percolator para la discriminación de identificaciones correctas e incorrectas de espectros en base al uso de una base de datos que sirve de señuelo (“decoy database”) para cuantificar la probabilidad de falsas identificaciones, y fijando un FDR (“False Discovery Rate”) del 1% como umbral para significación.

Cuantificación “label-free” MS:

Se utilizó el software para cuantificación “label-free” Progenesis Q1 or Proteomics (Non-Linear Dynamics, Waters) a partir de archivos digitales de imagen que contiene la totalidad de los datos de la imagen captada por el sensor (RAW). Se usaron 3 archivos RAW por cada muestra, procedentes de 3 experimentos separados. Las señales peptídicas representadas en tiempo de retención frente a relación m/z se alinearon y se cuantificaron a partir del “área bajo la curva” (AUC) para producir una lista de picos que se agruparon e identificaron con el buscador Proteome Discoverer (v 1.4) frente a la base de datos UniProt.

Análisis “dirigido” de Cys marcadas diferencialmente

Se utilizó el método de marcaje diferencial de Cys con d(0)NEM y d(5)NEM (McDonagh et al., 2014) para la selección de péptidos susceptibles de oxidación de grupos tiol. Los péptidos que contiene Cys se detectaron independientemente con la misma secuencia de aminoácidos tanto con la modificación con d(0) NEM como con la d(5)NEM, con un score equivalente a p-value de 0.01 fueron considerados “péptidos redox”. Con todos estos péptidos redox se elaboró una lista para un análisis dirigido utilizando datos de m/z, de tiempos de retención y espectros de fragmentación con el software abierto Skyline (Maclean et al., 2010). Este análisis permitió calcular la ratio “reducido/oxidado” (d(0)/d(5) NEM) de cada Cys a partir de la intensidades de cada ion parental individual.

Se usaron programas informáticos gratuitos como STRING (<http://stringdb.org/cgi/network.pl>), para ver los enriquecimientos en grupos funcionales de cada uno de los experimentos, y VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) para la obtención de diagramas de Venn.

4.4 Técnicas electroforéticas

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

Las electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizaron para el análisis de proteínas. La electroforesis se realizó en el sistema de mini geles X-Cell de Invitrogen. Los geles contienen 0.375 nM 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. El gel concentrador (pregel) contiene Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1% y acrilamida/bisacrilamida (19:1) al 5%. La polimerización se indujo añadiendo persulfato de amonio 0.08% como iniciador y 5 μ L de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) como catalizador. Las electroforesis se desarrollaron a 100V/20mA durante un tiempo variable, dependiendo también de la proteína a analizar, en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8.8 y glicina 192mM).

4.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizante

La realización de geles de poliacrilamida nativos permite realizar estudios de funcionalidad de las proteínas separadas mediante ensayos de actividad enzimática. Para la realización de dichos geles se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 4.3.1 pero excluyendo la adición de SDS tanto en la elaboración de los geles, como en la preparación de las muestras y en el tampón de electroforesis. Además, las electroforesis se realizan a 4°C para minimizar la desnaturización de las proteínas por el calentamiento de la muestra.

Se añadió una solución SSX4 (Sacarosa 20% (p/v), azul de bromofenol 0.05% (p/v)) como tampón de carga de las muestras en el gel. Para la realización del gel se utilizó una concentración de acrilamida 10% (v/v) y la electroforesis se desarrolló en un tampón de electroforesis (Tris 3.03 g, glicina 14.41g en 1L de H₂O mili-Q) a 4°C durante 1h a 15 mA.

Para la detección de la actividad de las Superóxidos Dismutasas (SODs). El gel se incubó en una solución de tinción (80mL de tampón Tris-HCl 0.05M pH 8.5, MTT 3-(4-5(dimetiltiazol-2)2-5 difeniltetrazolio bromuro) 10 mg, PMS (Metosulfato de fenazina) 6 mg y MgCl₂ 15 mg) en luz hasta observar la aparición de las bandas en el gel. Para parar la reacción se elimina la solución de tinción y se añade H₂O mili-Q. Finalizada la reacción se lavó el gel con H₂O destilada y se capturó la imagen con la cámara LAS-1000 de Fujifilm. Para la cuantificación de intensidad de las bandas se utilizó el programa Imagen, ImageJ-Fiji.

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

Para el análisis de la sulfinilación de la proteína Tsa1p (SO₃-Tsa1p) y para la determinación de la cantidad de la misma se transfirieron los geles de SDS-PAGE a membranas de polivinildenedifluoruro (PVDF) de *Amersan Biosciences*, mediante el sistema de transferencia húmeda X-Cell de *Invitrogen*, durante toda la noche a 20 V y 125 mA, 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 1 min y posteriormente se hidrataron en agua durante 10 min. Para la transferencia en el resto de experimentos de *Western blot* se transfirieron los geles a membranas dePVDF mediante transferencia semiseca con un aparato Novex® Semi-Dry Blotter (Life sequencing), durante 50 minutos a 20V y 125mA.

Para la inmunodetección, las membranas se incubaron en solución de bloqueo PBS-T (PBS con 0.1%, Tween 20 (v/v)), con 5% (p/v) de agente bloqueante (leche en polvo), durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido convenientemente en solución bloqueo durante toda la noche. Se realizaron 5 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 M5.

Tabla M.5 Anticuerpos utilizados en este trabajo

Ac 1^{ario}	Procedencia	Dilución	Ac 2^{ario}	Procedencia	Dilución
Anti-Ald	Rockland	1/500	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-Adh	Acris R1049	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-myc	Santa Cruz Biotechnology	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/20000
Anti-GFP	Santa Cruz Biotechnology	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-eIF2 α P (S51/S52)	Invitrogen	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-eIF2 α	John M. Zaborske	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-Rps6 (pS232/S233)	Abcam	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-Rps6	Abcam	1/1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-GSH	Virogen	1/1000	Anti-ratón	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-Sod1	Chemicon AB5482	1/3000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-Prx	Abcam	1/1000	Anti-ratón	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-SO ₃ -Prx	Abcam	1/3000	Anti-ratón	Santa Cruz Biotechnology	1/5000
Anti-Pgk1	Invitrogen	1/10000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/5000

4.4.4 Revelado y cuantificación

La detección de proteínas se llevó a cabo mediante luminiscencia, utilizando el kit de revelado ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), con una dilución 1:1 de soluciones 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 ImageGauge de Fuji.

4.5 Determinación de actividades enzimáticas

4.5.1 Catalasa

La actividad catalasa se midió siguiendo el método descrito por Jakubowski y col. (Jakubowski et al., 2000). Se realizaron los extractos celulares en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0 con inhibidor de proteasas 1X (complete Mini, EDTA-free de Roche). Se utilizaron de 10-50 µg de proteína en una solución extemporánea de H₂O₂ 35 mM. A los 5 s se determinó la velocidad de disminución de la absorbancia a 240 nm durante 1 min 30 s.

Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la descomposición de 1 µmol de H₂O₂ por minuto (actividad específica).

4.5.2 Zimogramas

La determinación de actividades enzimáticas de las Superóxido Dismutasas y la actividad catalasa en gel se lleva a cabo mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes según se describe en el apartado 4.3.2.

4.5.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

El ensayo de actividad en gel se realizó siguiendo el método descrito por Luk y Culotta (Luk and Culotta, 2001). Se realizaron los extractos celulares en tampón Tris-HCl pH 8.0 con inhibidor de proteasas. Tras la rotura en FastPrep®-24 durante 2 ciclos de 30 s a velocidad 5.0, se centrifugaron las muestras a 3000rpm durante 3 min. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (como se describe en el apartado 4.1).

5. MEDIDA DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

5.1 Análisis de los parámetros enológicos

5.1.1 Determinación de azúcares reductores

Este método es una adaptación del protocolo de Robyt y Whelan (Robyt and Whelan, 1972). Las diluciones correspondientes de los sobrenadantes de las vinificaciones se mezclaron con un volumen del reactivo (DNS) (ácido dinitro-3,5-salicílico 0.1g/mL, NaOH 16 mg/mL, tartrato doble Na-K 3g/L) y se hirvió 5 min a 100°C.

Materiales y Métodos

Se midió la $A_{540\text{nm}}$ y se interterpolaron las medidas de absorbancia en una curva patrón preparada a partir de una disolución stock de glucosa 2 g/L.

5.1.2 Determinación de etanol

La cuantificación enzimática de etanol se realizó 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 1mL al cual se añaden 200 μL de muestra (generalmente una dilución 1:5000 si medimos el final de una vinificación) o de una disolución patrón de etanol 1.2 mM. Se midió la A_{340} tras 15 min de incubación y se interpoló en la recta patrón.

5.1.3 Determinación de ácido acético, acetaldehído y glicerol

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

5.2 Determinación de la capacidad fermentativa

La capacidad fermentativa se determinó en medio YPGF, por su mayor similitud al mosto en cuanto al contenido de azúcares así como en mosto sintético MS300. Se inocularon 100 mL del medio (YPGF o MS300) en botellas de 250 mL con aproximadamente 1×10^7 células/mL y se comprobó la cantidad real de células mediante recuento en cámara cuentaglobulos Neubauer. Los cultivos se colocaron en un baño de agua a 30 °C con una agitación de 65 rpm y se determinó el gas producido durante la fermentación con un aparato FermoGraph (ATTO Corporation, Japón). El seguimiento de la producción de CO_2 se realizó cada 10 min durante 6 h. La capacidad fermentativa se puede expresar como volumen de CO_2 producido por unidad de tiempo y por número de células (Hoek et al., 1998).

5.3 Análisis del Metaboloma

Los análisis metabólicos globales se llevaron a cabo a través de la empresa METABOLON® (Durham, Nueva York). Se recogieron pellets de cultivos de células en mosto sintético MS300. Se congelaron a -80 °C hasta su uso. Las muestras se prepararon usando un sistema automático Microlab STAR® de la compañía Hamilton. Las proteínas se precipitaron con metanol bajo una rotura vigorosa durante 2 min (Glen Mills GenoGrinder 2000) y se centrifugaron. El extracto resultante se dividió en 5 fracciones: 2 para el análisis por (RP)/UPLC-MS/MS con un electrospray ionizante en modo iónico positivo (ESI), otra para el análisis por (RP)/UPLC-MS/MS con modo iónico negativo (ESI), una para el análisis por HILIC/UPLC-MS/MS con modo iónico negativo y otra muestra reservada como control. Se eliminaron los solventes orgánicos con TurboVap® (Zymark). Se utilizó cromatografía líquida de ultra afinidad (UPLC) ACQUITY de Waters junto con un espectrómetro de masas Orbitrap (Thermo Fisher).

Los extractos se deshidrataron y se reconstituyeron con diferentes solventes orgánicos. Una alícuota fue analizada usando condiciones iónicas ácidas, cromatográficamente optimizado para compuestos hidrofílicos. Se utilizó para la elución una columna C18 (Waters UPLC BEH C18-2.1x100mm, 1.7 μ m) usando agua, metanol y conteniendo 0.05% de ácido perfluoropentanoico (PFPA) y 0.1 de ácido fórmico (FA). Otra alícuota se analizó usando condiciones ión positivo ácidas, sin embargo ésta fue optimizada cromatográficamente para compuestos más hidrofóbicos. Se usó la columna C18 usando metanol, acetonitrilo, agua, 0.05% PFPA y 0.01% FA. Otra alícuota fue analizada en condiciones iónicas negativas. El extracto se eluyó con la columna C18 usando metanol, agua y bicarbonato de amonio 6.5 mM pH 8.0. La cuarta alícuota fue analizada utilizando una columna HILIC (Waters UPLC BEH Amida 2.1x150 mm, 1.7 μ m) usando un gradiente constante de agua y acetonitrilo con 10 mM de formato de amonio pH 10.8. Las muestras se analizaron en MS/MS Orbitrap y se recogieron los datos Raw identificando cada uno de los metabolitos usando hardware y software de la empresa METABOLON®. Este sistema fue construido en una plataforma web utilizando Microsoft's.NET technologies. Se identificaron los metabolitos por comparación con las librerías conteniendo tiempo de retención, relación masa (carga (m/z) y el cromatograma de todas las moléculas presentes en la librería.

La concentración de proteínas se normalizó utilizando el método Bradford. Para cada metabolito se realizó dos análisis *t-student* con el fin de asegurarse que las diferencias eran significativas.

5.4 Análisis de los parámetros redox

5.4.1 Cuantificación de glutatión

Para la determinación de glutatión se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción de esta molécula con el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). El protocolo realizado es una modificación de los descritos originalmente (Tietze, 1969; Griffith, 1980).

Se recogieron células en diferentes medios y en diferentes etapas de crecimiento y se resuspendieron en 1 mL de HCl 8mM y ácido 5-sulfosalicílico 1.3% (p/v) a 4 °C. Las células se rompieron con 0.6g de perlas de vidrio y alternando 3 ciclos de 30 seg a velocidad 5.0 m/s con un aparato FastPrep®-24. Tras la rotura se mantuvieron en hielo 15 min más y finalmente se recuperó el sobrenadante tras centrifugación a 13000 rpm, 15 min (4°C).

La valoración del glutatión total se realizó mezclando 200 μ L de muestra con 120 μ L de cóctel enzimático preparado en el momento que contenía NADP 0.4 mg/mL (Sigma), glucosa-6-fosfato 0.16 mg/mL (Sigma), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 3 μ g/mL (Sigma), glutatión reductasa 1 mU (Sigma), MES 0.2 M y EDTA 2mM disueltos en un tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.0. Se añadieron 480 μ L de ditiotris-nitrobenzoico (DTNB) 200 μ M, se incubó 20 min exactos en agitación y oscuridad y se midió la A_{420nm} .

Materiales y Métodos

Para la valoración del glutatión oxidado (GSSG), los 200 μL de muestra se incubaron previamente 1h con 40 μL de una solución de 2-vinilpiridina 1 M (Sigma) que acompleja el glutatión en su forma reducida impidiendo su reacción con el DTNB.

Para medir el glutatión unido a la proteína (PSSG) se siguió el protocolo de (Bukowski et al., 2015) y (Grant et al., 1998) adaptado a nuestras condiciones. Se recogieron células y una vez realizada la extracción de proteínas como se indica al inicio de este apartado, se resuspendió el sedimento en tampón fosfato 0.01M pH 7.4 con urea 6M (sigma) y N-etilmaleimida (NEM) 10 mM (sigma). Se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se hicieron 3 lavados con acetonitrilo (Sigma) para eliminar los restos de NEM. Se resuspendió el pellet en 1% de borohidrido sódico (Sigma), se agitó en el aparato FastPrep®-24 y se centrifugó durante 1 h a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se neutralizó el sobrenadante con tampón borato 100mM pH 9.0 (Sigma). Se valoró el glutatión unido a la proteína con el mismo procedimiento que el glutatión reducido y el oxidado. En todos casos, se realizaron rectas patrón de 0 a 16 μM de GSSG (Sigma) que fueron sometidas a los mismos tratamientos que las muestras. La cantidad de glutatión reducido (GSH) se calculó por la diferencia entre el glutatión total y el glutatión oxidado. Los resultados se expresaron en nmoles de glutatión por mg de células.

5.4.2 Cuantificación de trehalosa

Los extractos celulares para la cuantificación de trehalosa se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Parrou y François (Parrou and François, 1997) adaptado a placas de 96 pocillos. 100 mg de células fueron resuspendidas en 0.75 mL de Na_2CO_3 250 mM y se incubaron a 95 °C durante 4 horas. La determinación se realizó utilizando 75 μL de extracto por muestra, al que se le añadió 225 μL de una mezcla de ácido acético 1 M y tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.2 (1:4) y posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 30 s. Se incubaron 150 μL del sobrenadante con 8.4 mU de trehalasa comercial (Sigma) a 37 °C durante 12-16 horas con agitación, incluyéndose en el ensayo blancos con extracto pero vsin trehalasa. Para cada ensayo, se realizó una recta patrón de trehalosa entre 0 y 20 μg que fue procesada de la misma forma que los sobrenadantes obtenidos.

Seguidamente, se hirvieron las muestras para detener la reacción, se centrifugaron y se valoró la glucosa liberada mediante ensayo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa. La cantidad de trehalosa intracelular se expresó en μg de trehalosa por mg de células.

5.4.3 Medida de las especies reactivas del oxígeno

Para el estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) se siguió el protocolo descrito en Ballester-Tomás y colaboradores (Ballester-Tomás et al., 2015). Se inocularon las células en YPD a una OD_{600} de 0.25 a partir de precultivos de toda la noche.

Se dejó crecer hasta una OD_{600} de 0.5 a 30°C y se tomó una alícuota control. Se trató con rapamicina 100 nM durante 1h de crecimiento a 30°C y se recogió una segunda alícuota correspondiente a estrés en fase exponencial y, finalmente se dejó el cultivo un día, tomando una tercera alícuota en fase estacionaria.

Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS 10mM (pH 7.2) y se resuspendieron en el mismo tampón. A continuación, se añadió dihidrorodamina 123 (DHR 123, Sigma) a concentración final de 5 µg/mL a partir de un stock 2.5 mg/mL disuelto en etanol. Las células se incubaron durante 90 minutos a 28 °C y oscuridad. Se recogieron las células, se lavaron en PBS y se analizaron usando el canal anexina V y muerte celular de un citómetro de flujo Muse Cell Analyzer (Millipore). Se incluyó un control negativo (con DHR-123 y células sin tratar) y uno positivo (con DHR-123 y células estresadas con 4 mM de H₂O₂ durante 60 min). Los datos se expresan en porcentaje de células que contienen DHR-123.

6. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

6.1 Transformación de *Escherichia coli*

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron según el protocolo del RbCl (Hanahan, 1983). Se partió de células competentes obtenidas previamente, conservadas a -80 °C (Sambrook, J. and Russell, 2001) y descongeladas en hielo. Se añadió entre 1 y 20 ng de DNA en un volumen no superior al 5% (v/v) del volumen de células competentes, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 min en hielo. Seguidamente se dio un choque térmico a 42 °C durante 90 s y se dejó de nuevo en hielo 5 min. Las células fueron recuperadas después añadiendo 4 volúmenes de medio LB e incubando durante 1 h a 37°C. Finalmente se plaquearon en medio selectivo LB con ampicilina.

6.2 Construcción de mutantes de *S. cerevisiae*

La manipulación genética de levaduras se realizó mediante la estrategia de recombinación homóloga de secuencias cortas, presentes en oligonucleótidos con los cuales se amplifican genes de selección. En el caso de las interrupciones se utilizó el marcador reciclable *loxP-KanMX-loxP* presente en el plásmido pUG6 (Güldener et al., 1996).

Como norma general se amplificó el cassette de interrupción utilizando 100 pmoles de los oligos de 60 nucleótidos, llamados a y b en la tabla M.3, y 50 ng del plásmido en un volumen de 100 µL. Se purificaron los fragmentos con un kit de purificación de fragmentos de PCR (Ultra clean®PCR clean-ip kit (MoBio)) y se transformó directamente según el protocolo que se describirá en el 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 interrumpir) y el oligonucleótido K2 que ceba en el gen *KanMX*. Para detectar la presencia de copias adicionales intactas del gen en proceso de delección se utilizó el

par de oligos c/d, donde d corresponde a una zona de 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 del gen, 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 seleccionados en cicloheximida se crecieron en YPD con 1 μ L de cicloheximida durante toda la noche y se lavaron con YPGalactosa, incubándose durante 3 horas para permitir la expresión de la recombinasa, se diluyó en cultivo sembrándose en placas de YPD. Se seleccionaron aquellas colonias incapaces de crecer en placas conteniendo genética, y se comprobó la eliminación del gen reportero mediante un par de oligos c/e, donde e es un oligo que hibrida con la región 3'-UTR del gen en cuestión, de manera que la PCR da una banda de tamaño reducido cuando el gen reportero es eliminado.

Para la construcción de mutantes de sobreexpresantes con los promotores de *SPI1* y de *MET17*, se utilizaron como molde para la PCR los plásmidos pKanMX-SPI1p y pKanMX-MET17p, respectivamente (Tabla M.2), 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-13 y con GFP se utilizaron los plásmidos PFA6a-13Myc-KanMX6 y pFA6-GFP-KanMX6, respectivamente (Longtine et al., 1998) y se procedió de manera similar.

Para la construcción de células petite rho⁰ se siguió el protocolo descrito en (Carter, 1986). Se inoculó en medio mínimo SD a partir de un precultivo en medio rico YPD de toda la noche. Se le añadió bromuro de etidio a una concentración final de 10 μ g/mL. Se dejó crecer el cultivo y se sembró utilizando las diluciones oportunas en placas de YPEG (3% glicerol, 0.1% de glucosa, 2% peptona y 1% de extracto de levadura) y se analizaron las colonias según el crecimiento en YPGlicerol para comprobar la respiración deficiente.

6.3 Transformación de levadura

Las transformaciones de *S. cerevisiae* se realizaron siguiendo el método del acetato de litio (Ito et al., 1983), con las modificaciones introducidas por Gietz (Hammond, 2003). A partir de cultivos de una noche en YPD, las células se diluyeron en 50 mL de este mismo medio de cultivo hasta una D.O₆₀₀ de 0.2. Cuando se alcanzó una D.O₆₀₀ entre 1 y 2 se recogieron las células por centrifugación y se lavaron 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 por transformación.

Se centrifugaron y se resuspendieron en una mezcla de 240 μ L de una solución 50% (p/v) de polietilenglicol (peso molecular 3350), 36 μ L de LiAc (1M), 50 μ L de DNA carrier (2mg/mL) y 34 μ L del DNA transformante, completando el volumen con agua. El tubo se agitó de forma vigorosa con vortex durante 1 min, se incubó a 30 °C durante 20 min y seguidamente se realizó un choque térmico de 20 min 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+genética o SD+cicloheximida.

7. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

En todos los experimentos de fluorescencia se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i.

Para el estudio de agregados de las proteínas Tsa1p y de Hsp104p se inoculó un cultivo de medio mínimo SD a partir de un precultivo de toda la noche en YPD a una D.O₆₀₀ de 0.2. Se recogieron células cuando el cultivo alcanzó fase exponencial en este medio y se incubó con H₂O₂ 0.6 mM durante 30 min y con acetidina-2-ácido carboxílico (AZC) 5 mM durante 2 h en agitación y 30 °C. Posteriormente se recogió una alícuota de cada uno de los cultivos y se visualizó.

Para el estudio de los gránulos de estrés se inoculó un cultivo de medio mínimo SD o de mosto sintético a partir de un precultivo crecido durante toda la noche en YPD a una D.O₆₀₀ de 0.2. Se cogieron alícuotas de diferentes días en el medio de mosto sintético, se centrifugaron y se lavaron con agua destilada estéril y se visualizó en el microscopio. Para el cultivo en medio mínimo SD se dejaron crecer las células hasta estado exponencial y se incubaron entre 30 min-1 h en medio SD sin nitrógeno (SD-N) y en medio SD sin glucosa (SD-G) en agitación y a 30°C. Posteriormente se recogió una alícuota, se centrifugó y lavó y se visualizó en el microscopio con un filtro FITC.

8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En todos los resultados de carácter cuantitativo 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 independientes 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 con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL COMPLEJO TRANSCRIPCIONAL SAGA Y SU CONEXIÓN CON LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN POR NUTRIENTES. IMPORTANCIA DE LA MITOCONDRIA EN LONGEVIDAD CRONOLÓGICA

En este capítulo se aborda el estudio de varios de los mecanismos que están implicados en la regulación de la longevidad cronológica en levaduras vínicas industriales. Como se ha comentado en la Introducción, la longevidad cronológica es la capacidad que tienen las células de mantenerse viables con el paso del tiempo en un estado de no división. En este estado, es importante la activación de los mecanismos de supervivencia en el que cobran especial relevancia las rutas de señalización de nutrientes, la maquinaria de acetilación y desacetilación, la autofagia y la respuesta a estrés. En *S. cerevisiae* hay dos rutas principales de respuesta a la disponibilidad de nutrientes con implicación contrastada en la longevidad: la ruta TORC1/Sch9p, que responde a la disponibilidad de nitrógeno, y la ruta PKA que responde a la disponibilidad de fuente de carbono fermentable en el medio. En condiciones de fase estacionaria en la cual se han agotado los nutrientes, la desactivación de estas rutas es la responsable de activar genes de respuesta al ayuno y permitir la supervivencia, como se verá adelante.

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado en eucariotas que permite el reciclaje de componentes celulares mediante su degradación en compartimentos líticos. Como ya se ha descrito, en *S. cerevisiae* hay varios tipos de autofagia, siendo la macroautofagia la que se induce por ayuno de nitrógeno permitiendo el reciclaje de moléculas para obtener energía y mantener el pool celular de aminoácidos. Por otro lado, está la maquinaria de acetilación/ desacetilación que es un conjunto de proteínas encargadas de producir un cambio en la condensación de la cromatina y activar o inhibir la transcripción, proceso fundamental para todo tipo de respuestas adaptativas. El complejo multiproteico SAGA está implicado no solo en la regulación del inicio de la transcripción, sino también en fases posteriores del ciclo de los mRNAs, incluyendo su exportación del núcleo.

Se ha descrito en numerosos trabajos la importancia del estrés oxidativo y de la maquinaria implicada en la respuesta antioxidante en la regulación de la longevidad a través de la producción de ROS, no solo frente a estrés ambiental sino también frente a estrés oxidativo endógeno casado por el metabolismo, sobretodo por la respiración mitocondrial.

1.1 Papel del complejo SAGA en longevidad cronológica y autofagia

1.1.1 Las proteínas Ubp8p y Spt20p regulan la longevidad cronológica y la autofagia

Estudios previos en nuestro laboratorio han descrito el papel de la acetiltransferasa Gcn5p, perteneciente al módulo histona acetiltransferasa (HAT) del complejo transcripcional SAGA, en la longevidad cronológica en fermentación vínica así como su relación con la autofagia en condiciones de ayuno de nitrógeno. La proteína Gcn5p controla la degradación por autofagia de la aldehído deshidrogenasa Ald6p en condiciones de ayuno de nitrógeno (Orozco et al., 2012c) por lo que resulta interesante investigar la implicación de otras proteínas pertenecientes al complejo SAGA en la longevidad cronológica y en la autofagia en dichas condiciones.

Para abordar dicho objetivo se construyeron mutantes de delección en las cepa vínica industrial haploide C9 de los genes *SPT20*, perteneciente al módulo estructural SPT (Saga-associated supPressor of Ty) y *UBP8*, perteneciente al módulo de desubiquitinización (DUB). Se eligieron estos genes por su papel en distintas funcionalidades del complejo SAGA. Por una parte Ubp8p es una deubiquitinasa, la segunda actividad enzimática de SAGA, junto a Gcn5p, mientras que Spt20p es una proteína esencial para el ensamblaje del complejo (Gurskiy et al., 2013; Lee et al., 2011). Se estudió el comportamiento de los mutantes *ubp8Δ* y *spt20Δ* en medios de envejecimiento (SC y SC 1/25), como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartados 2.2.2 y 2.2.3), analizando el número de células viables con el paso del tiempo mediante conteo de unidades formadoras de colonia por mL de cultivo. La Figura 1.1A muestra los resultados obtenidos en medio mínimo completo (SC).

En condiciones de envejecimiento en medio de laboratorio el mutante en la ubiquitin ligasa Ubp8p parece no tener efecto sobre la longevidad cronológica. Por el contrario el mutante de delección del gen que codifica para la proteína estructural del complejo SAGA, *SPT20*, sí que presenta una longevidad cronológica menor, lo cual podría ser debido a que la ausencia de esta proteína afecta a la formación y función del complejo SAGA. La delección de *GCN5* causa una reducción similar, lo que confirma que esta actividad es la relevante para LC (Figura 1.1).

Resultados y discusión

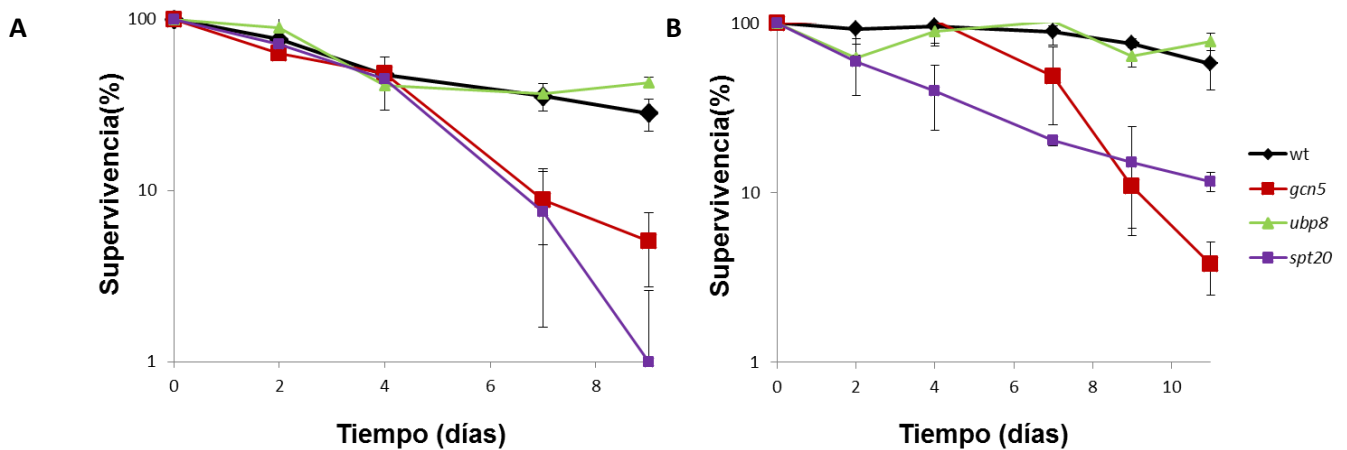


Figura 1.1 Papel del complejo SAGA en envejecimiento cronológico. Experimentos de longevidad cronológica (LC) en la cepa haploide vínica industrial C9 y en los mutantes del complejo SAGA, *gcn5*Δ, *ubp8*Δ y *spt20*Δ en medio mínimo completo (SC) (A) y medio mínimo completo con bajo nitrógeno (SC 1/25N) (B). 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 por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Para estudiar la relevancia de estos genes en condiciones de restricción dietaria causada por la disminución (o ayuno) de nitrógeno en el medio, se realizaron experimentos de envejecimiento cronológico en medio mínimo completo con 1/25 de fuentes de nitrógeno asimilables. Este medio simula las condiciones de bajo nitrógeno que ocurre en el mosto de uva durante la fermentación ya que simula su ratio carbono/nitrógeno, como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartados 2.2.3) (Orozco et al., 2012b). En este medio las levaduras crecen mucho más lento debido a la limitación de fuentes asimilables de nitrógeno, por ello se toma el día 7 de crecimiento como el 100% de viabilidad. Como se puede observar en la Figura 1.1 B, la longevidad cronológica de la cepa silvestre en condiciones de ayuno de nitrógeno es mayor que en el medio mínimo completo, como cabe esperar en estas condiciones de restricción dietaria. Muchos autores han demostrado el papel de la disminución del aporte de nutrientes, sin inducir la malnutrición, en la extensión de la longevidad (Cummings and Lamming, 2016; Fontana et al., 2013; Kapahi et al., 2016). Una vez más, el mutante en *UBP8* presenta unas curvas de supervivencia similares al silvestre, lo cual refuerza la conclusión de que esta actividad del complejo SAGA no juega un papel importante en la longevidad en condiciones tanto de alto como de bajo contenido en nitrógeno. La mutación de *SPT20* provoca una caída de la longevidad, lo que indica que la integridad del complejo SAGA es determinante para la longevidad, independientemente de las condiciones nutricionales de la célula. De manera similar, la delección de *GCN5* provoca también una disminución de la LC incluso con bajo nitrógeno. Por ello, la integridad del complejo SAGA y su actividad HAT, aportada por Gcn5p, juegan un papel importante en la longevidad cronológica independientemente del contenido de nitrógeno.

A continuación se realizaron experimentos encaminados a detectar la autofagia de la proteína Ald6p en condiciones de ayuno de nitrógeno, tal como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.2.4) de los mutantes *ubp8Δ* y *spt20Δ* en la cepa vínica haploide C9 mediante detección por *western blot* (apartado 4.1, 4.4.1 y 4.4.3 de Materiales y Métodos). Previamente se deletó el gen mitocondrial que codifica para la aldehído deshidrogenasa 4, Ald4p, en las cepas de interés ya que al tener una masa molecular similar a Ald6p interfiere en su detección. Como control de carga se utilizó la alcohol deshidrogenasa (Adh1), que no se degrada por autofagia.

Como se puede observar en la Figura 1.2, en la cepa silvestre a 15 h de crecimiento en medio mínimo sin nitrógeno, comienza a disminuir los niveles de Ald6p que termina desapareciendo a las 25 h de ayuno de nitrógeno. El mutante *ubp8Δ* presenta un cierto bloqueo de la autofagia que es mucho más acentuado en el mutante *spt20Δ*, donde el nivel de Ald6p se mantiene intacto tras 25 h sin nitrógeno.

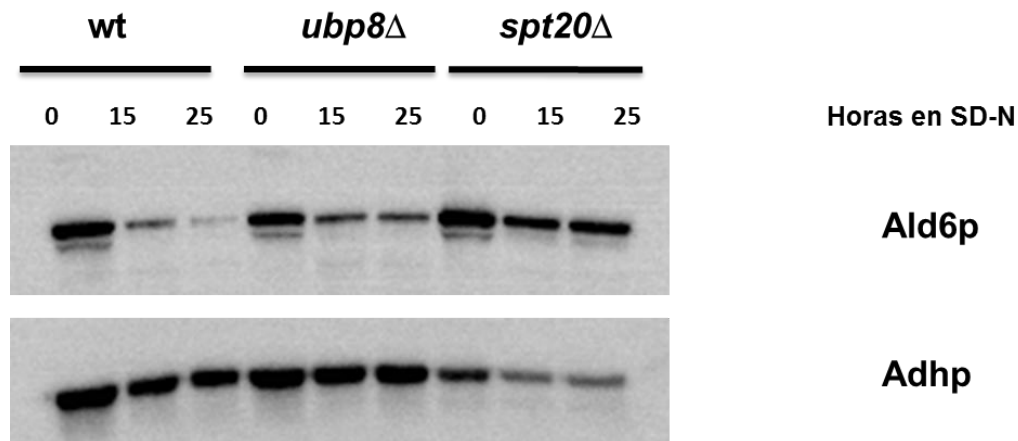


Figura 1.2 Papel del complejo SAGA en autofagia por ayuno de nitrógeno. Determinación del nivel de Ald6p mediante *Western Blot* y detección con el anticuerpo anti-Ald, en el wt y en los mutantes *ubp8Δ* y *spt20Δ* en la cepa C9 *ald4Δ* en condiciones de autofagia.

Estos resultados indican que la integridad del complejo SAGA, además de la actividad de Gcn5p, pero no la actividad desubiquitinasa de Ubp8p, es importante para la autofagia en condiciones de ayuno de nitrógeno y que ésta pérdida de la capacidad autofagocítica podría explicar la menor longevidad cronológica observada en los correspondientes mutantes en medios de laboratorio.

1.1.2 Papel de los componentes del complejo SAGA en la fermentación en mosto

1.1.2.1 Fermentación en mosto Sintético MS300

Con el fin de estudiar el papel de estas proteínas en el proceso de fermentación vínica, se realizaron experimentos de microfermentación en mosto sintético MS300 (Figura 1.3) como se describe en el apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos, un medio estandarizado que permite comparar con resultados anteriores de nuestro grupo (Orozco et al., 2012c) y de otros (Rossignol et al., 2003) utilizando la cepa vínica haploide C9 (Figura 1.3). En la Figura 1.3 se muestra el crecimiento en mosto sintético MS300 de los mutantes *ubp8Δ* y *spt20Δ* en la cepa haploide C9. Se analizaron las unidades formadoras de colonia por mL mediante siembra en placa durante la fermentación (A). Como se puede observar, el mutante *ubp8Δ* presenta un crecimiento similar al de la cepa control, con viabilidades en las últimas etapas de la vinificación ligeramente menores que la cepa parental. Tomando como el 100% de viabilidad el crecimiento donde *ubp8Δ* alcanza una mayor densidad celular (día 3), podemos representar la cinética de muerte celular o de viabilidad en porcentaje y escala logarítmica (B), observando una caída en la longevidad cronológica máxima en mosto sintético del mutante *ubp8Δ* con respecto a la cepa parental.

El mutante *spt20Δ* tiene un comportamiento diferente al mutante *ubp8Δ*, alcanza un número notablemente menor de células, lo que supone un defecto grave en el crecimiento. La longevidad cronológica cae al final del proceso fermentativo. Estos resultados nos vuelven a indicar que Spt20p juega un papel muy importante en el crecimiento celular y en el correcto ensamblaje del complejo SAGA que es importante para la longevidad en medios muy diferentes.

Para seguir la evolución de la fermentación vínica y determinar el impacto de las deleciones realizadas en la capacidad de los mutantes de completar la fermentación, se tomaron muestras a distintos tiempos de la fermentación y se midió los azúcares reductores (glucosa y fructosa) tal como se describe en el apartado 5.1.1 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 1.3 C, el mutante *ubp8Δ* es capaz de fermentar por completo la concentración de 200g/L de azúcares presentes en el MS300 y por ello, terminar la fermentación, incluso más rápidamente que la cepa silvestre, terminando el consumo de los azúcares mucho antes, a día 5, lo que sugiere que tiene un metabolismo más acelerado. La velocidad de consumo de los azúcares en el mutante *spt20Δ* es notablemente inferior a la cepa silvestre, permaneciendo una cantidad de azúcar residual aun cuando el silvestre ha terminado la fermentación, posiblemente este efecto en el mutante es debido al número muy inferior de células viables, causando una parada de fermentación al final de la misma.

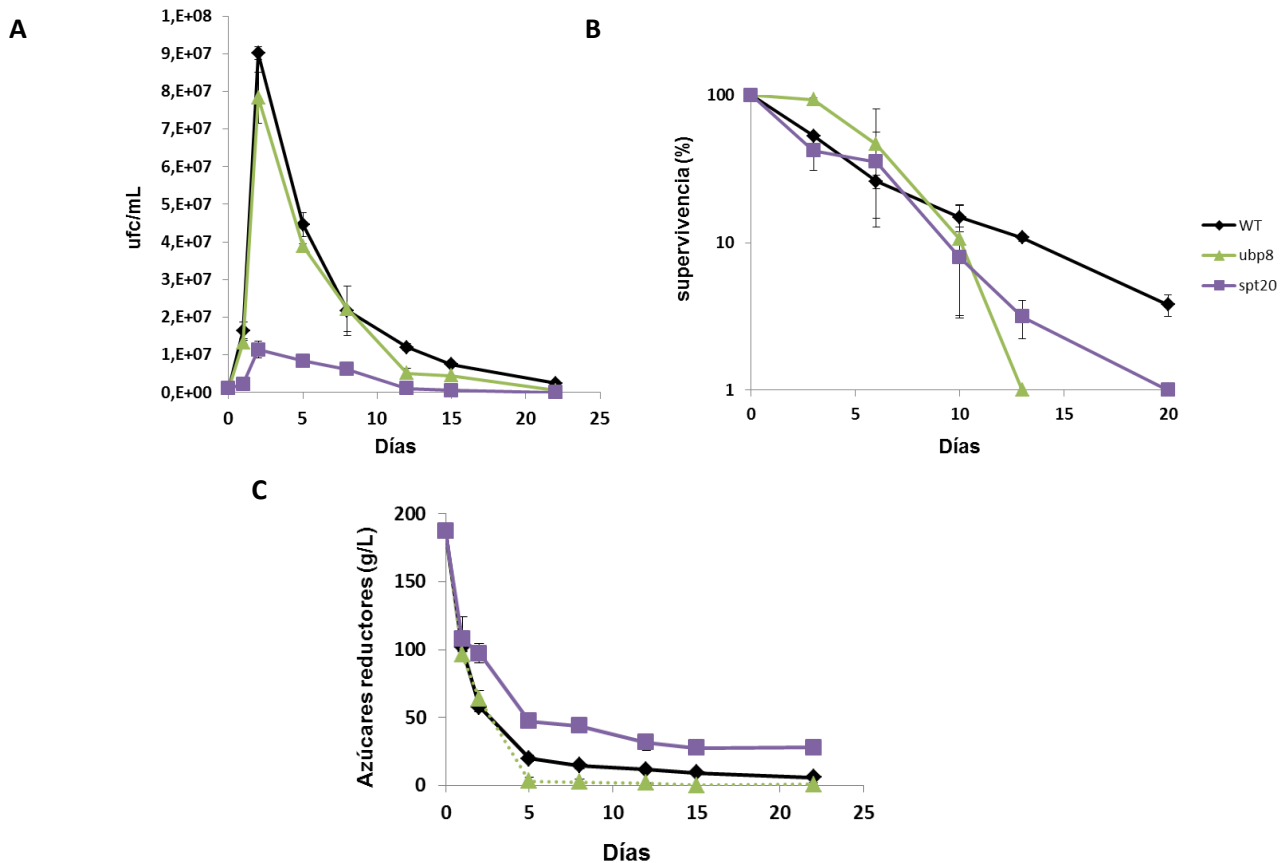


Figura 1.3 Efecto de las mutaciones en *ubp8Δ* y *spt20Δ* en la fermentación alcohólica en mosto sintético MS300. Curva de crecimiento de los mutantes *ubp8Δ* y *spt20Δ*. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica, el día 3 de la gráfica A es tomado como 100% de viabilidad (B). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (C). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Posteriormente, se analizó la concentración de etanol, glicerol, ácido acético y acetaldehído al final de cada una de las fermentaciones vínicas realizadas con los mutantes, tanto por su importancia para el producto final de la fermentación, el vino, como por su importancia en la longevidad cronológica. En la Figura 1.4 se muestra la concentración de los diferentes metabolitos al final de la fermentación. Como se puede observar, no hay diferencias significativas en la producción de etanol, ácido acético y glicerol, lo que indica que, a pesar de haber diferencias en el consumo de azúcar y en el crecimiento en los mutantes, son capaces de finalizar la fermentación vínica y generar un producto final muy similar a como lo hace la cepa silvestre.

Sólo es de destacar las diferencias en concentración de acetaldehído en el mutante *ubp8Δ* (Figura 1.4 C), que no explican la caída de longevidad de ese mutante, considerando el potencial efecto negativo del acetaldehído en longevidad cronológica (Orozco et al., 2012b).

Resultados y discusión

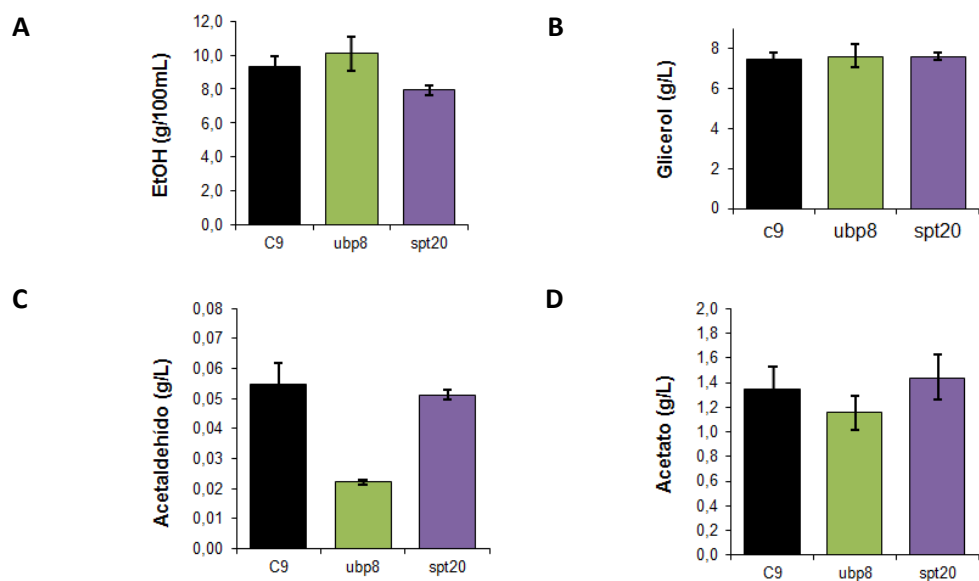


Figura 1.4 Producción de metabolitos de interés al final de la fermentación alcohólica en mosto sintético MS300. Determinación de etanol (A), glicerol (B), acetaldehído (C) y acetato (D) al final de la fermentación en los mutantes *ubp8* Δ y *spt20* Δ . Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

1.1.2.2 Fermentación en mosto natural de la variedad tempranillo

Para corroborar si el efecto estudiado ocurre también en mosto natural y en una cepa diploide industrial L2056, se deleccionaron las dos copias del gen *SPT20* y de *UBP8* con el fin de estudiar el comportamiento de estas cepas en condiciones de fermentación en este tipo de mosto (variedad tempranillo). En la Figura 1.5 A se representa el crecimiento en unidades formadoras de colonia por mL de los mutantes y la cepa silvestre en mosto natural. Como se puede observar, los dos mutantes presentan un fenotipo de crecimiento similar al de mosto sintético. El mutante *ubp8* Δ presenta un perfil de crecimiento similar al silvestre (Fig 1.5 A). Si tomamos el día 3 de crecimiento como el 100% de viabilidad, Fig 1.5 B, observamos que el mutante de delección de *UBP8* presenta una ligera caída en la longevidad cronológica, no tan acusada como en mosto sintético (Figura 1.3B).

En cuanto al mutante *spt20* Δ presenta, al igual que en el mosto sintético, (Figura 1.3 A), una disminución dramática del crecimiento (Figura 1.5 A) lo que viene acompañado con una disminución de la viabilidad, Figura 1.5 B.

Como podemos observar, la diferencia de crecimiento y de viabilidad en el mutante *spt20* Δ es independiente del medio, confirmando la importancia de la proteína Spt20p en estas características fisiológicas. Como en los experimentos anteriores en mosto sintético, se midió la capacidad de estas cepas de completar el consumo de los 232.7 g/L de azúcares presentes en el mosto natural utilizado.

Como se observa en la Figura 1.5 C, al igual que en el mosto sintético, Fig. 1.3 C, el mutante *spt20Δ* presenta un metabolismo más ralentizado que se traduce en un consumo más lento de los azúcares del mosto y un tiempo final de fermentación más largo. A pesar de este metabolismo más lento, el mutante *spt20Δ* es capaz de terminar la fermentación y produce en el vino la misma cantidad de etanol que la cepa silvestre (Figura 1.5D).

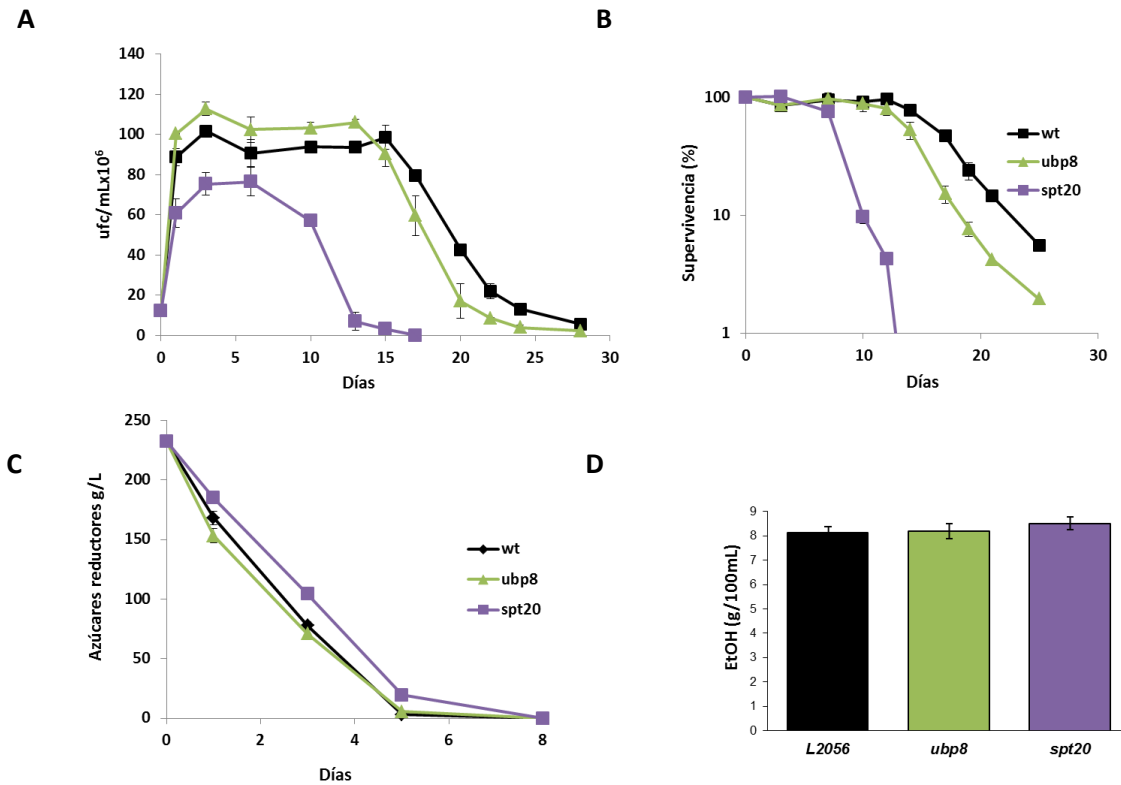


Figura 1.5 Efecto de las mutaciones en *ubp8Δ* y *spt20Δ* en la cepa industrial diploide L2056 en la fermentación alcohólica en mosto natural de la variedad tempranillo. Curva de crecimiento de los mutantes *ubp8Δ* y *spt20Δ*. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (**A**). Curva de longevidad cronológica tomando el día 3 de crecimiento de la gráfica A como 100% de viabilidad (**B**). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (**C**). Determinación de etanol al final del proceso de fermentación (**D**). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

En el caso del mutante *ubp8Δ* no hay diferencias significativas ni en el consumo de los azúcares ni en la producción de etanol al final de la fermentación.

1.1.3 Papel de las proteínas del complejo SAGA en diferentes condiciones de crecimiento

Debido a las deficiencias de crecimiento del mutante *spt20Δ* en las distintas condiciones ensayadas, se realizaron ensayos adicionales por goteo en placa con diferentes tipos de condiciones de crecimiento como fuentes de carbono distintas o inhibidores de la síntesis de aminoácidos, detallados en Materiales y métodos (apartado 2.2.5).

Resultados y discusión

En la Figura 1.6 A se muestra los resultados de estos experimentos. Como se puede observar, el mutante *spt20* Δ presenta un claro defecto de crecimiento en condiciones de respiración (Panel A, medio YPG, con glicerol). Esta deficiencia podría explicar el envejecimiento acelerado observado en medios mínimos con y sin nitrógeno, Figura 1.1, ya que en, medios con 2% glucosa, a partir de las 10-12 h de crecimiento se produce el cambio diáxico, la transición de metabolismo fermentativo hacia metabolismo respiratorio, y en esas circunstancias Spt20p parece determinante.

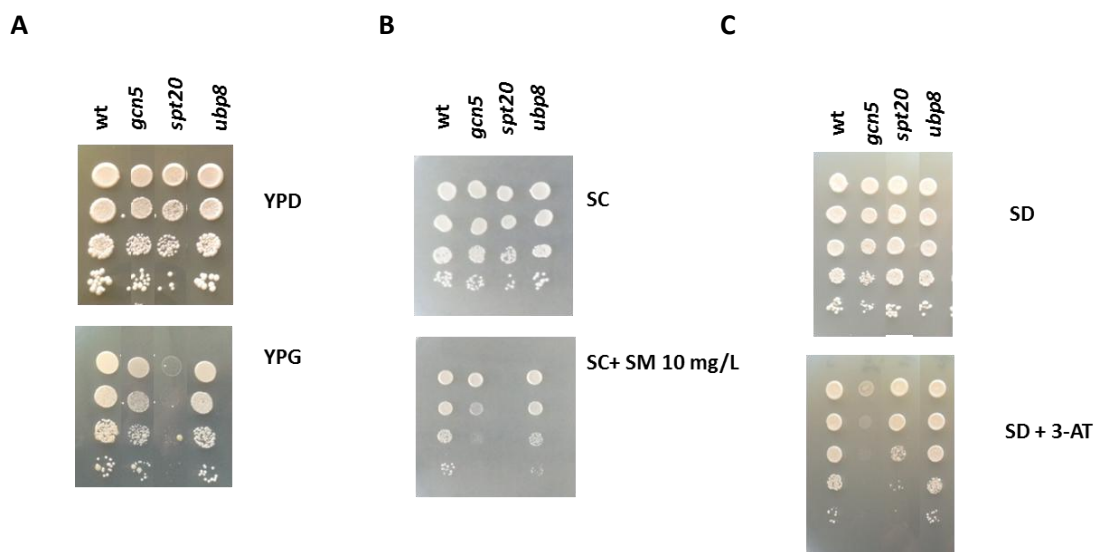


Figura 1.6 Papel de las proteínas del complejo SAGA en respiración y ayuno de nitrógeno. Goteos en placa de YPD y de YP con glicerol como fuente de energía (YPG) (A) Goteos en placa de medio mínimo SD y en el mismo medio con el compuesto inhibidor de la síntesis de aminoácidos ramificados, sulfometurón metil (SM) 10 mg/L (B). Goteos en placa de medio mínimo sin la mezcla de aminoácidos o drop-out (SD) y en el mismo medio con el compuesto inhibidor de la síntesis de histidina, 3-amino-1, 2,4-triazol (3AT) 10mM (C).

Se realizaron también goteos en placa en medio mínimo con dos compuestos que inhiben la síntesis de aminoácidos causando un ayuno interno, los herbicidas sulfometurón metil (SM) a una concentración de 10mg/mL y 3- aminotriazol (3AT) 10mM. Como se puede observar, el mutante *gcn5* Δ presenta una disminución clara del crecimiento en presencia de este herbicida, disminución que resulta muchísimo más acusada en el caso del mutante *spt20* Δ , que no puede crecer en presencia del SM.

El crecimiento del mutante *ubp8* Δ apenas se ve afectado por la adición de SM lo que indica que la actividad de desubiquitinación no es relevante en estas condiciones. Respecto del efecto del 3AT, los resultados recogidos en la Figura 1.6 C muestran un defecto total de crecimiento del mutante *gcn5* Δ mientras que el crecimiento del mutante *spt20* Δ se ve afectado de forma mucho menos acusada.

Estos datos indican la implicación de la proteína estructural Spt20p del complejo SAGA en la respuesta al ayuno de nitrógeno como se ha observado en la Figura 1.1 en la que el mutante en *SPT20* tiene una menor longevidad cronológica independientemente del contenido de nitrógeno lo que conecta con el bloqueo de la autofagia de la Ald6p en condiciones de ayuno de nitrógeno. Este efecto de supervivencia en estado estacionario del mutante *spt20Δ* (Figura 1.1) podría explicarse por el defecto de crecimiento en fuentes de carbono respirables. Como se ve en las placas con glicerol (Figura 1.6). La proteína Spt20p por lo tanto, es necesaria para la extensión de la longevidad en condiciones estacionarias, para la autofagia en ayuno de nitrógeno, para la respiración y tiene un papel en la respuesta a la disminución de aminoácidos de la familia de la leucina (leucina, isoleucina y valina) y no tanto por el ayuno de histidina. Como se ha comentado en varias ocasiones a lo largo de la tesis, el crecimiento de las levaduras en el mosto de uva está limitado por el bajo contenido de nitrógeno que presenta. Debido a la deficiencia del mutante *spt20Δ* para crecer en respuesta al ayuno de nitrógeno y el defecto de crecimiento en presencia del herbicida SM que produce un ayuno de aminoácidos de cadena ramificada, se produce una ralentización en el crecimiento del mutante *spt20Δ* en mosto sintético tanto en la cepa haploide C9 como en la cepa diploide L2056 (Figura 1.3A y 1.5A respectivamente).

Por otro lado, la acetiltransferasa Gcn5p es necesaria para la extensión de la longevidad cronológica en medio SC y SC con 1/25 de nitrógeno asimilable (Figura 1.1) así como para la autofagia de la Ald6p en ayuno de nitrógeno (Orozco et al., 2012c). Se ha observado que *GCN5* es necesaria para la respuesta al ayuno de nitrógeno relacionado con la síntesis de histidina y no tanto a través de otros aminoácidos como los de la superfamilia de la leucina (Figura 1.6). Debido a estas diferencias, se procedió a estudiar la interacción de Gcn5p con las rutas relevantes en la señalización por ayuno de nutrientes.

1.2 Interacción entre Gcn5p y la ruta de respuesta a la disponibilidad de nutrientes TORC1/Sch9p

Como ya se ha comentado, la delección de *GCN5* bloquea la extensión de la longevidad cronológica por la inhibición química de TORC1 durante la vinificación en mosto natural (Orozco et al., 2012c). Sch9p es una quinasa en la que convergen varias rutas implicadas en la regulación de la longevidad, entre ellas la ruta TORC1, la ruta Snf1p y la que controla la síntesis de esfingolípidos. A su vez influye en una plétora de procesos como la biogénesis de ribosomas y la producción de glicerol, entre otros (Huang et al., 2012; Huber et al., 2011; Johnson, 2010; Kos-Braun et al., 2017).

1.2.1 Conexión entre Gcn5p y Sch9p y su papel en la regulación de la extensión de la longevidad cronológica

Debido al papel de Sch9p en longevidad y a la conexión que, en estudios anteriores, se ha descrito de la acetiltransferasa Gcn5p con la ruta de señalización de nutrientes TORC1 respecto a por ejemplo su relación con la respuesta retrógrada, se decidió estudiar la conexión que hay entre Gcn5p y TORC1/Sch9p en condiciones de envejecimiento cronológico en medio mínimo completo (SC).

Como se observa en la Figura 1.7 A, el mutante *gcn5Δ* presenta una caída en la longevidad cronológica en condiciones de envejecimiento en este medio, igual que se había observado previamente (Figura 1.1 A). Sin embargo, el mutante *sch9Δ* presenta una notable extensión de la longevidad cronológica, siendo sensiblemente mayor que la de la cepa silvestre, como ha sido descrito en otros trabajos (Fabrizio and Longo, 2003a). Con el fin de estudiar interacciones entre las proteínas de interés se obtuvieron los correspondientes dobles mutantes en la cepa haploide vínica C9. El doble mutante *gcn5Δsch9Δ* muestra un longevidad cronológica reducida respecto de la del mutante *sch9Δ*, aunque aún más alta que la de la cepa silvestre y mayor que la del mutante simple *gcn5Δ*. Esto sugiere, que al menos una parte de los mecanismos que promueven la longevidad de *sch9Δ* requieren la actividad de *GCN5*. A su vez, la adición de la delección de *SCH9* al mutante *gcn5Δ* extiende la longevidad con respecto al mutante simple *gcn5Δ* pero no como el mutante *sch9Δ*.

La combinación de las mutaciones en *GCN5* y *TOR1* produce unos efectos cualitativamente equivalentes a la combinación *gcn5Δsch9Δ* (Figura 1.7 B), pero cuantitativamente menos llamativos. El mutante *tor1Δ* también presenta una extensión de su longevidad cronológica, que ha sido descrita en muchos trabajos, pero no es tan pronunciada como en el mutante *sch9Δ*. Al igual que en la combinación de *sch9Δ* con *gcn5Δ*, al disrupir *GCN5* en el mutante *tor1Δ*, se observa el bloqueo de la extensión de la longevidad del mutante *tor1Δ*. En este caso la supresión es más intensa, teniendo el doble mutante un fenotipo similar a la delección simple de *GCN5*. Esto demuestra, una vez más, que hay una conexión entre la ruta de señalización de respuesta a nitrógeno TORC1/Sch9p y la actividad acetiltransferasa de Gcn5p, conexión que está implicada en la modulación de la longevidad cronológica.

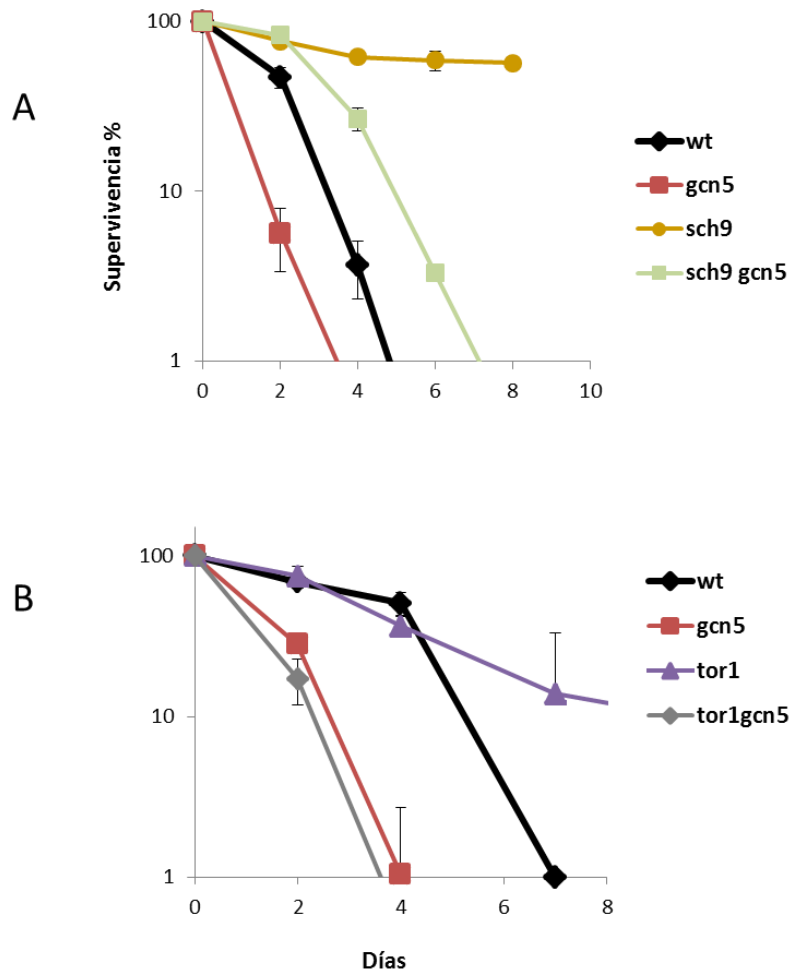


Figura 1.7 Efecto de la delección de *GCN5* en la ruta de respuesta a nutrientes *TOR1/sch9p*. Supervivencia de los mutantes *gcn5Δ*, *sch9Δ* y el doble mutante *gcn5Δsch9Δ*. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de envejecimiento en medio mínimo completo (SC) **(A)**. Curva de longevidad cronológica de los mutantes *gcn5Δ*, *tor1Δ* y el doble mutante *gcn5Δtor1Δ* **(B)**. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

1.2.2 Identificación de *RGM1* como un potencial vínculo entre *GCN5* y *SCH9*

Debido a la importancia de Sch9p en la longevidad cronológica y su conexión con la acetiltransferasa Gcn5p, se decidió investigar la existencia de algún gen que interactuase física o genéticamente con *GCN5* y *SCH9* y los relacionase. Para ello se buscó en diferentes bases de datos incluidas en el *Saccharomyces* Genome Database (SGD), como en el buscador de interacciones GENEMANIA (<http://genemania.org/>).

En la Figura 1.8 se observan las interacciones, tanto genéticas en verde, como físicas en rosa, entre los genes *SCH9* y *GCN5*. *SCH9* interactuana físicamente y genéticamente con el factor de transcripción *RGM1*. Este factor de transcripción ha sido relacionado con la función subtelomérica (Jorgensen et al., 2004) y con la represión por glucosa (Estruch, 1991). Además, *RGM1* también interactuana genéticamente con *GCN5* (Costanzo et al., 2010).

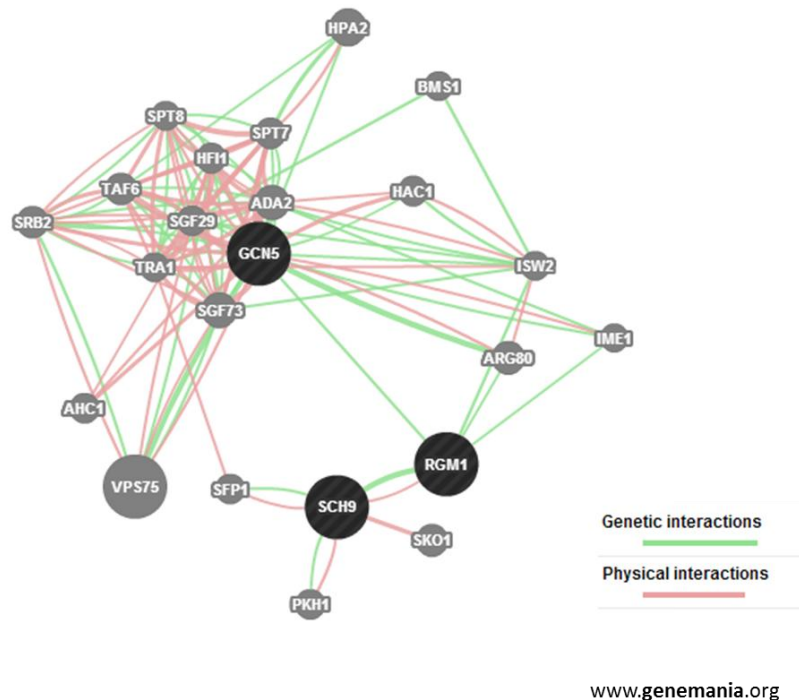


Figura 1.8 Red de interacciones genéticas y físicas entre los genes *SCH9* y *GCN5*. Gráfico obtenido de la página web gratuita genemania.org junto con la base de datos de Saccharomyces Genome Database (SGD). Se muestran las interacciones entre los genes *GCN5* y *SCH9*, físicas en color rosa y genéticas en verde.

Debido al nexo de unión que establece *RGM1*, se analizó el comportamiento del mutante *rgm1Δ* en longevidad cronológica. Para ello, se realizó la delección de las dos copias del gen *RGM1* en la cepa diploide vónica L2056, con el fin de ensayar tanto el crecimiento en mosto natural como el envejecimiento en dicho medio y en medio mínimo completo (SC). En la Figura 1.9 A se representa el crecimiento en mosto a lo largo del proceso de vinificación, observándose que, no hay diferencias significativas entre el mutante *rgm1Δ* y la cepa silvestre. Tomando el día de máximo crecimiento (día 10) como 100% de viabilidad, se representó la viabilidad en porcentaje y escala logarítmica a lo largo del proceso fermentativo, para obtener las curvas de supervivencia que se representan en la Figura 1.9 B. Se puede ver que el mutante *rgm1Δ* tiene una ligera extensión de la longevidad cronológica al final del proceso fermentativo. En cuanto al consumo de los azúcares, Figura 1.9 C, no hay diferencias significativas a lo largo del proceso fermentativo así como tampoco las hay en la producción de etanol y de glicerol al final de la fermentación (Figura 1.9 D).

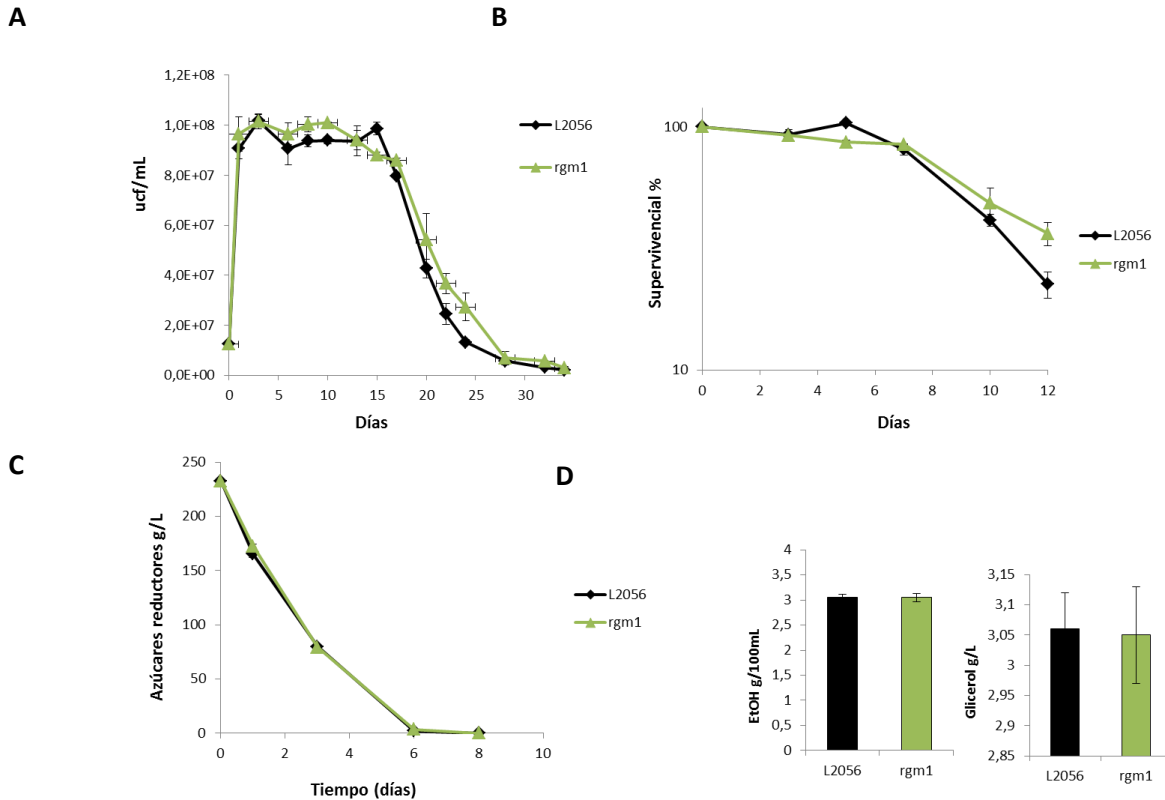


Figura 1.9 Comportamiento de la vinificación en mosto natural del mutante *rgm1*. Crecimiento, en unidades formadoras de colonia por mL, de la cepa silvestre diploide vínica L2056 y su derivada mutante en *RGM1* en función del tiempo de fermentación **(A)**. Curva de supervivencia tomando el día 10 como 100% de viabilidad, representada en porcentaje y en escala logarítmica **(B)**. Representación del consumo de los azúcares reductores en g/ L a lo largo del proceso fermentativo **(C)**. Producción de etanol en g/100mL y de glicerol en g/L, al final de la fermentación **(D)**. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Se realizaron también curvas de viabilidad del mutante *rgm1* Δ en medio mínimo completo SC, y como se puede observar en la Figura 1.9 B, no hay diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre. Para completar la caracterización fenotípica del mutante *rgm1* Δ , se decidió medir la cantidad de trehalosa, ya que se ha descrito que es uno de los factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con la síntesis de trehalosa (Mak et al., 2009; Smith et al., 2011). La trehalosa es un disacárido que confiere protección frente a diferentes tipos de estrés durante el crecimiento de las levaduras así como una mayor longevidad. Como se muestra en la Figura 1.10 A, aunque podría haber una cantidad de trehalosa ligeramente superior en la cepa en el mutante *rgm1* Δ que en la cepa silvestre, no hay diferencias significativas en la acumulación de este metabolito.

Resultados y discusión

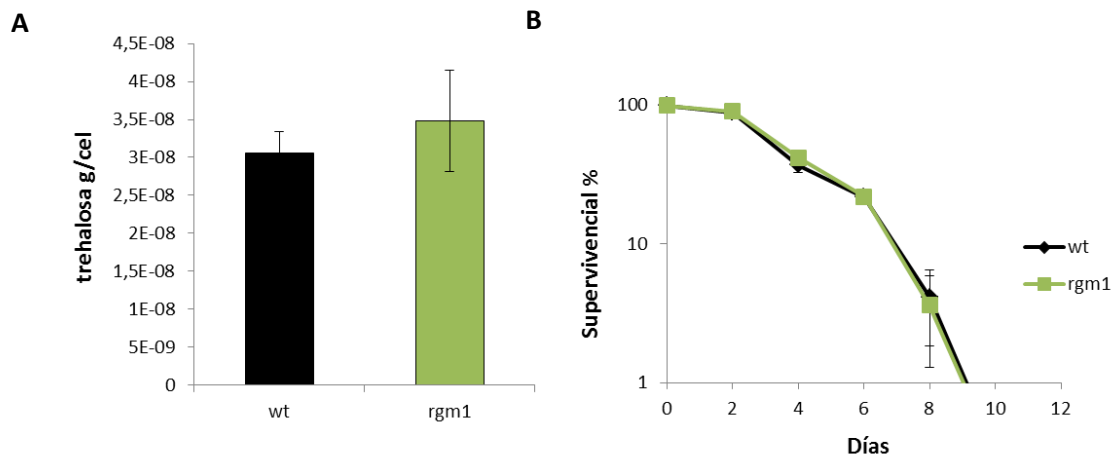


Figura 1.10 Producción de trehalosa y viabilidad en el mutante *rgm1Δ*. Producción de trehalosa en g/célula (A). Curva de supervivencia tomando el día 3 de crecimiento en medio completo SC como 100% de viabilidad (B). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Una vez estudiado el efecto de la delección de *RGM1* en longevidad, se combinó la mutación *RGM1* con la de los genes *SCH9* y *GCN5* para detectar posibles interacciones genéticas. Por simplicidad, estos experimentos se realizaron en la cepa haploide C9. En la Figura 1.11, se representa la gráfica de supervivencia en medio completo SC. Como ocurre con el mutante en la cepa diploide (Fig. 1.9), el mutante *rgm1Δ* en la cepa C9 no presenta diferencias significativas de longevidad cronológica respecto de la cepa silvestre.

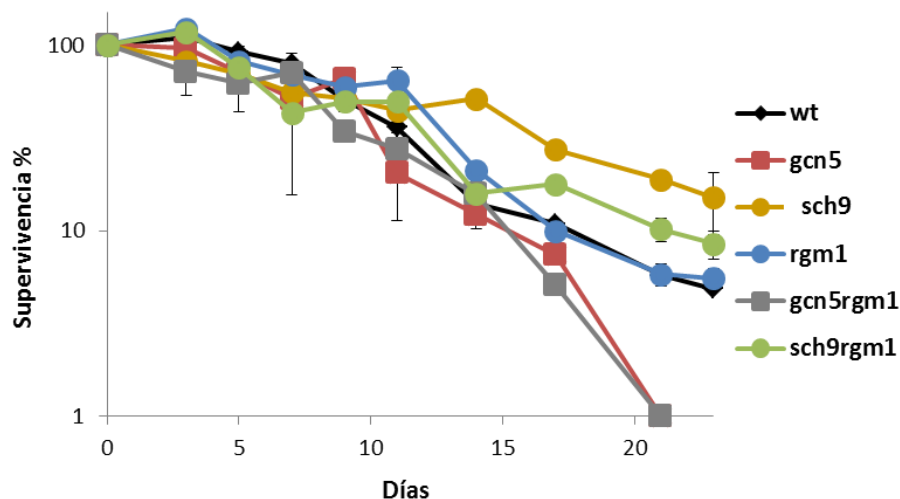


Figura 1.11 Longevidad cronológica de mutantes simples y dobles en los genes *RGM1*, *SCH9* y *GCN5* en medio completo SC. Se representa la viabilidad en porcentaje tomando el día 3 de crecimiento en medio SC como 100% de viabilidad frente al tiempo. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Cuando se combina con la delección de *GCN5*, el doble mutante *rgm1Δgcn5Δ* tiene un fenotipo de LC prácticamente indistinguible del mutante *gcn5Δ* simple, lo que sugiere que *RGM1* no tiene un papel adicional a Gcn5p y podría ser controlado por este complejo de regulación transcripcional. Sin embargo, cuando la mutación en *RGM1* se combina con la *sch9Δ*, se observa una pérdida parcial de la extensión de longevidad característica del mutante simple *sch9Δ*, lo que sugiere que Rgm1p tendría un papel, aunque limitado, en la regulación de la longevidad cronológica dependiente de Sch9p.

1.2.3 Estudio de la conexión de *RGM1*, *SCH9* y *GCN5* en mosto natural

A continuación se estudió el papel de *RGM1* en el control de la longevidad y el crecimiento de los mutantes *sch9Δ* y *gcn5Δ* en la cepa C9 en condiciones de fermentación en mosto natural de la variedad tempranillo. En la Figura 1.12 A podemos observar el crecimiento de los mutantes simples y dobles a lo largo de la fermentación. Al igual que en trabajos previos de nuestro laboratorio, en estas condiciones de crecimiento se observan más diferencias significativas entre las cepas. El mutante *sch9Δ* tiene un gran defecto en el crecimiento comparado con la cepa silvestre indicando la importancia de la ruta en la que participa esta proteína en condiciones de fermentación en mosto natural, como cabe esperar de una ruta que promueve la síntesis de proteínas. Como ya se ha mencionado, el mosto es un medio muy complejo en el que hay alrededor de un 20% de azúcares reductores y el crecimiento de la levadura en este medio es diferente al de un medio de laboratorio que es mucho más simple y que contiene sólo un 2% de glucosa de manera que la levadura sólo tiene un metabolismo fermentativo durante las primeras horas. En el mosto de uva la levadura se encuentra con diferentes tipos de estrés que tiene que eliminar o activar mecanismos de respuesta a estos. Con estos antecedentes cabe esperar que un mutante en *SCH9*, que interviene en procesos de señalización por nutrientes así como en la biogénesis de ribosomas, tenga un defecto en la longevidad cronológica en este medio.

Este fenotipo es mucho más acusado cuando se combina la mutación de *sch9Δ* con *rgm1Δ* y especialmente con *gcn5Δ*, donde el número de células es muy pequeño. Los mutantes simples de *gcn5Δ* y *rgm1Δ* presentan perfiles de crecimiento similares al de la cepa silvestre, que se ven muy reducido en combinación con *sch9Δ*.

En estos experimentos se tomó el día 7 de crecimiento como 100% y se representó la viabilidad en porcentaje frente al tiempo, Figura 1.12B. La delección de *RGM1* no produce ningún cambio en la longevidad cronológica al igual que ocurría en el medio SC. Por el contrario, la delección de *GCN5* extiende ligeramente la longevidad cronológica en mosto, tal como se ha descrito previamente en este trabajo y en trabajos anteriores del laboratorio (Orozco et al., 2012c). Sorprendentemente, la delección de *SCH9* en mosto natural produce una caída de la longevidad cronológica. Este fenotipo es totalmente opuesto a la extensión de la longevidad de la delección de *SCH9* en medio SC lo cual indica que *SCH9* es necesario para la extensión de la longevidad específicamente en condiciones de fermentación en mosto.

Resultados y discusión

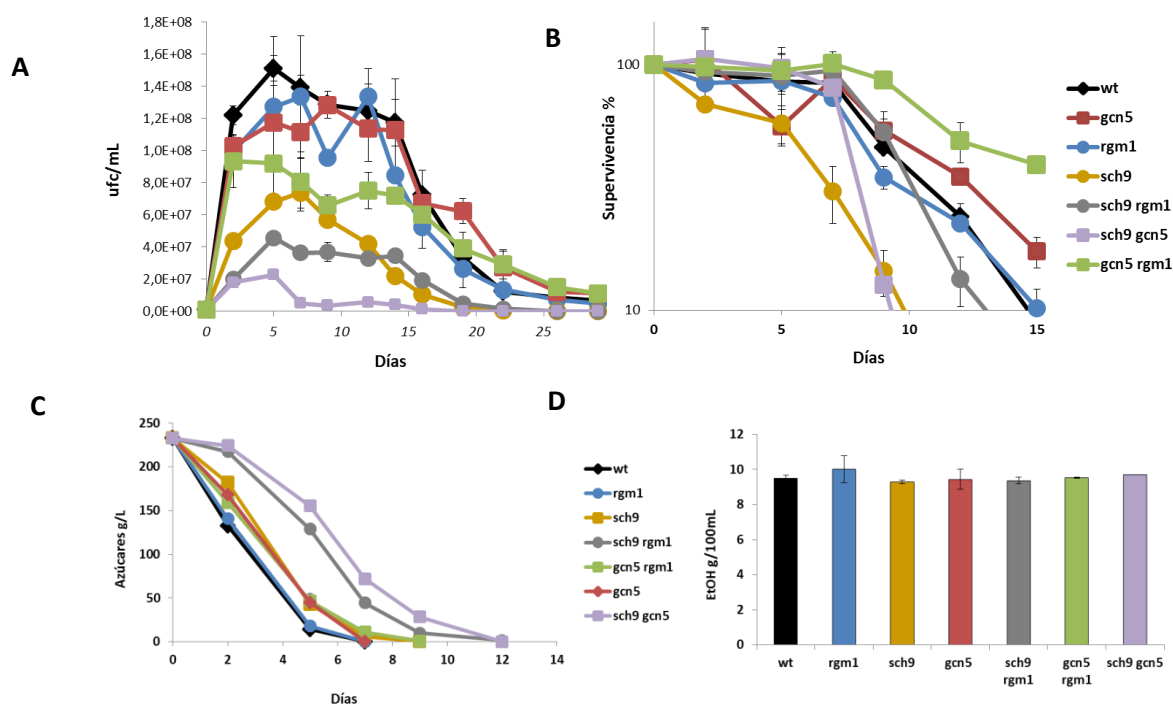


Figura 1.12 Conexión SCH9 con GCN5 y RGM1. Curva de crecimiento de los mutantes simples *gcn5* Δ , *sch9* Δ , *rgm1* Δ y dobles combinados. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (**A**). Curva de longevidad cronológica, el día 5 de crecimiento de la gráfica A es tomado como 100% de viabilidad (**B**). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (**C**). Determinación de etanol al final del proceso de fermentación (**D**). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

En las curvas de supervivencia de los dobles mutantes se puede observar que el doble mutante *sch9* Δ *gcn5* Δ presenta una longevidad cronológica muy corta que podría estar relacionado con el crecimiento defectuoso de la cepa, Figura 1.12A. Este resultado demuestra que *SCH9* es el principal determinante de la longevidad en condiciones de vinificación y que su delección suprime cualquier efecto positivo de la delección de *GCN5*.

En el caso de la combinación con *RGM1* con *GCN5* la longevidad cronológica se ve extendida en el doble mutante mientras que con *SCH9* se ve reducida. De manera que *RGM1* tiene un papel negativo en la extensión de la longevidad por vías en apariencia diferentes en las que están involucrados *GCN5* y *SCH9*. Se midieron los azúcares reductores a lo largo de la vinificación, Figura 1.12C, se observa una correlación entre el crecimiento, Figura 1.12A, y la velocidad de consumo de azúcares. Así, aquellos mutantes que presentan un crecimiento menor o más lento, tienen una velocidad menor de consumo de los azúcares. Este es el caso de *sch9* Δ *gcn5* Δ y *sch9* Δ *rgm1* Δ que al tener un crecimiento menor, tiene un consumo de los azúcares mucho más ralentizado.

Es decir, existe una relación entre la disminución del crecimiento de los dobles mutantes entre *SCH9* y *GCN5* así como *SCH9* y *RGM1* que se traduce en un menor consumo de los azúcares y un defecto en la extensión de la longevidad cronológica que no es tan drástico si observamos otros mutantes cuyo crecimiento es mucho mayor que estas cepas (*rgm1* Δ).

La combinación de la delección de estos genes establece una conexión entre ellos que ralentiza el metabolismo pero, a pesar de esta deficiencia en el crecimiento y esta ralentización del consumo de los azúcares, todos los mutantes ensayados terminan de consumir todos los azúcares presentes en el mosto y son capaces de producir etanol al final de la fermentación, sin diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre, como se observa en la Figura 1.12D.

1.3 Papel de la mitocondria en longevidad cronológica

La mitocondria es la fuente de energía de la célula en condiciones de metabolismo respiratorio así como, también, de especies reactivas del oxígeno que producen distintos tipos de daño celular, tal y como se ha descrito en la Introducción. En condiciones de crecimiento en mosto, *S.cerevisiae* presenta un metabolismo fermentativo debido al alto contenido en azúcares pero en procesos como la producción de biomasa y su deshidratación, el metabolismo es respiratorio lo que produce especies reactivas del oxígeno y por lo tanto, hace interesante el estudio de los mecanismos de protección frente el estrés oxidativo y su relación con la LC en diferentes condiciones que puedan producir daño oxidativo. En la Introducción se ha comentado que existe un complejo transcripcional parecido a SAGA que se denomina Saga-LIKE el cual contiene prácticamente todas las proteínas que contiene el complejo SAGA y también, la proteína Rtg2p que es una proteína de la ruta de respuesta retrógrada. De manera que en este capítulo, se analiza la importancia de la mitocondria en la longevidad cronológica y respuesta a estrés mediante tres aproximaciones diferentes: mediante el estudio del efecto del genoma mitocondrial de dos cepas del género *Saccharomyces*, mediante el estudio de la longevidad en función de la actividad mitocondrial y mediante el estudio del papel de la ruta de respuesta retrógrada en longevidad cronológica.

1.3.1 Estudio del impacto del genoma mitocondrial de *S. uvarum* y *S. cerevisiae* en híbridos interespecíficos

Se analizó el impacto de genoma mitocondrial en la respuesta al estrés oxidativo y en la longevidad usando híbridos interespecíficos sintéticos entre *S. cerevisiae* y *S. uvarum* aislados por el laboratorio del Dr Phillippe Marullo (Da Silva et al., 2015). La naturaleza isogénica del DNA nuclear de ambos híbridos nos permite analizar el papel del origen del DNA mitocondrial en la fermentación, estrés oxidativo y longevidad.

A pesar de ser *S. cerevisiae* la que se implante generalmente en la fermentación vínica, se ha visto a *S. uvarum* en fermentaciones espontáneas generalmente a bajas temperaturas y cada vez hay un mayor interés por los cultivos iniciadores mixtos para mejorar la calidad del vino. *S. uvarum* es una de las más prometedoras en este aspecto ya que tiene alta tolerancia al etanol, baja producción de ácido acético y capacidad de fermentar el mosto de uva a baja temperatura (Masneuf-Pomarède et al., 2010) lo cual ayuda a mejorar los perfiles aromáticos del vino.

Resultados y discusión

Se utilizaron las cepas de *S. uvarum* U2 y *S. cerevisiae* W1, así como dos híbridos interespecíficos WU12 distintos, en función del origen de su genoma mitocondrial, el que lleva el DNA mitocondrial de *S. uvarum* WU12-1 y el que lo lleva de *S. cerevisiae* WU12-8 (Albertin et al., 2013). Como se puede observar en la Figura 1.13 A, se analizó la respuesta a estrés de las cepas parentales y los híbridos mediante goteo en placa de YPD sin y con peróxido de hidrógeno 4 mM (H_2O_2). Las cepas parentales U2 y W1 tienen diferente sensibilidad al H_2O_2 , siendo muchísimo más susceptible la cepa *S. uvarum*. En cuanto a los híbridos interespecíficos, WU12-1 (mt- *S.u*) tiene un crecimiento mucho menor que WU12-8 (mt *S.c*) lo cual apoya la hipótesis de que el legado mitocondrial podría tener un impacto en la resistencia frente al estrés oxidativo.

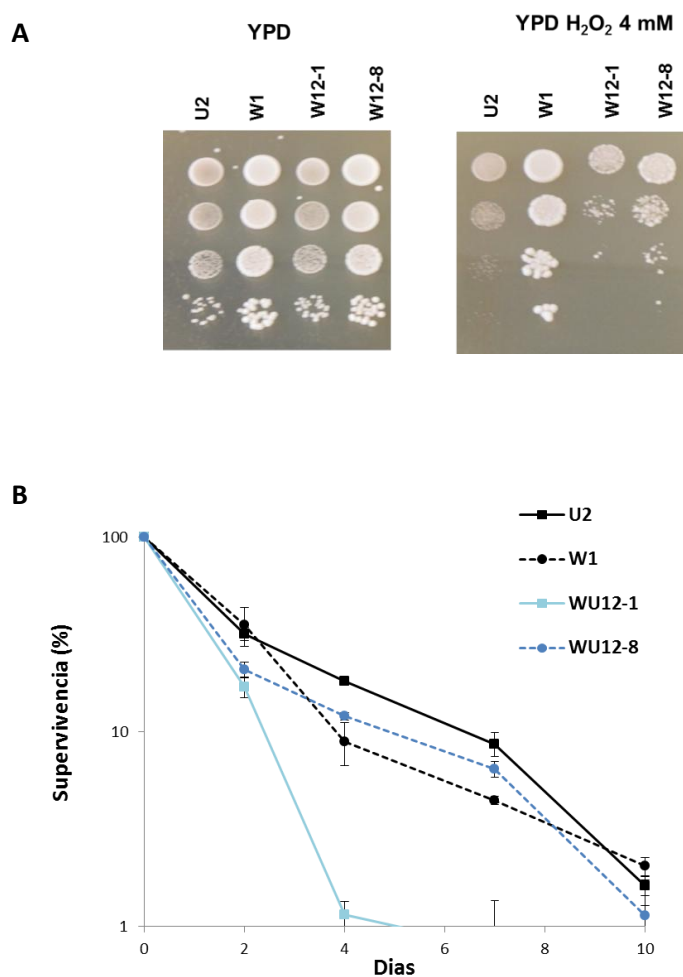


Figura 1.13 Papel del origen de la mitocondria en longevidad cronológica y tolerancia a estrés en híbridos conteniendo el DNA mitocondrial de *S.uvarum* (WU12-1) o el de *S. cerevisiae* (Wu12-8), en comparación junto con las cepas parentales de *S. uvarum* (U2) y de *S. cerevisiae* (W1). Goteos en placa de YPD y de YPD con 4 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (A) Curva de viabilidad en medio mínimo completo (SC) tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad (B). Las medidas se realizaron por triplicado. Se muestran la media y la desviación típica (DT).

En la Figura 1.13 B se muestra la longevidad cronológica de estas cepas, analizada como se describe en el apartado 2.2.3 de Materiales y Métodos, para ver el papel potencial del origen de la mitocondria en el envejecimiento. En estas condiciones, U2 y W1 muestran una longevidad cronológica similar sin embargo, el híbrido que contiene la mitocondria de *S. uvarum* (WU12-1) presenta una longevidad cronológica significativamente menor. Dado que esta cepa presenta también una menor tolerancia al estrés oxidativo, los resultados sugieren que el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* aporta una función mitocondrial que permite mejor respuesta frente al estrés oxidativo, y que esto podría extender la longevidad cronológica. Con el fin de obtener más información del papel del genoma mitocondrial en la longevidad, se realizaron microfermentaciones en mosto natural y se analizaron distintos parámetros que se recogen en la Figura 1.14. Como se observa en el panel A, *S. uvarum* consigue llegar a una mayor densidad celular que *S. cerevisiae*, aunque esta decae más rápidamente al final de la fermentación. No hay diferencias significativas en el crecimiento de los híbridos, que en este caso, se asemejan mucho más a la cepa parental de *S. cerevisiae*.

Se tomó el máximo de densidad celular de crecimiento en mosto (día 5) como 100% de viabilidad y se realizaron las curvas de viabilidad representadas en porcentaje y en escala logarítmica en el panel B. observándose de nuevo una LC de los híbridos mucho más parecida a la del parental *S. cerevisiae*, mayor que la del parental *S. uvarum*, que en este caso presenta una la LC más baja.

Se midió también el consumo de azúcares como indicador de la evolución de la fermentación. En la Figura 1.14 C se representa el consumo de los 187.5 g/L de azúcares presentes en el mosto frente al tiempo de fermentación. No hay diferencias significativas entre las cepas, incluyendo los híbridos, lo que sugiere que los efectos contrapuestos de diferente crecimiento y longevidad en las cepas analizadas se contrarrestan en las condiciones de fermentación en mosto natural ensayadas. Además, también se puede concluir que el origen del genoma mitocondrial no es tan relevante como el genoma nuclear durante la fermentación vínica, aunque no se pueda descartar que tenga un papel más determinante en ambientes naturales o industriales donde se favorezca un metabolismo respiratorio.

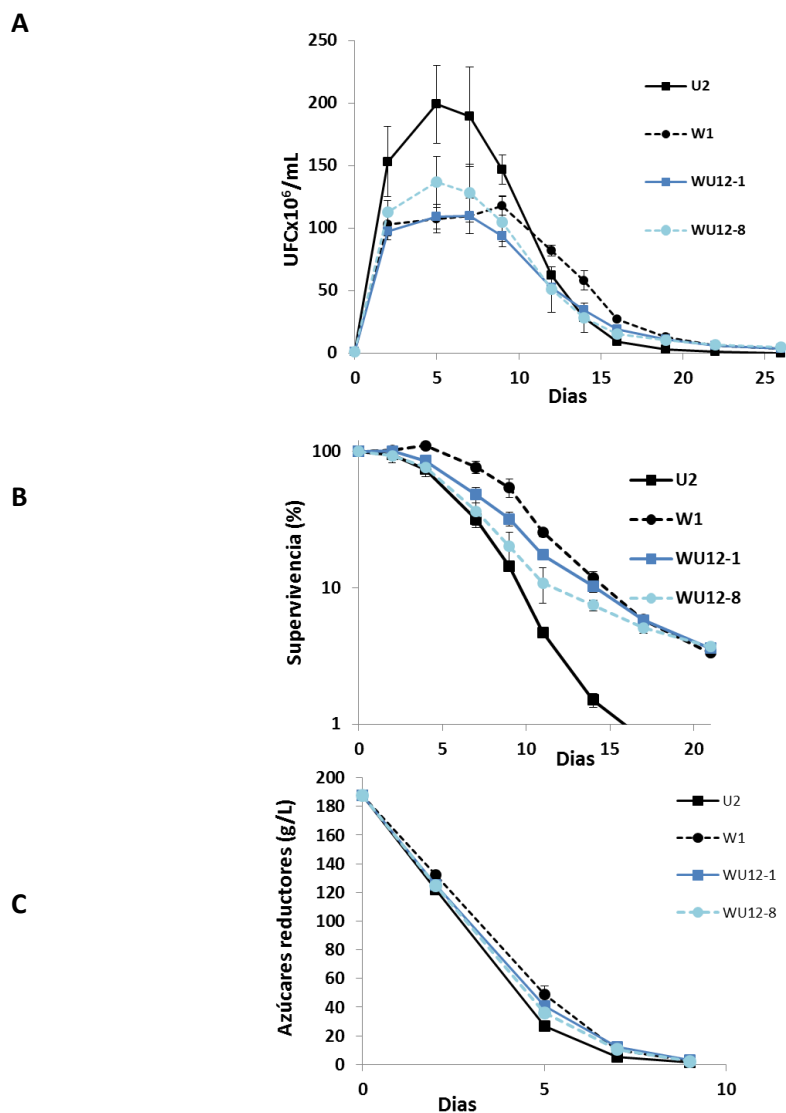


Figura 1.14 Papel de la mitocondria en fermentación en mosto natural en híbridos conteniendo el DNA mitocondrial de *S. uvarum* (WU12-1) y el de *S. cerevisiae* (WU12-8) junto con las cepas control de *S. uvarum* (U2) y de *S. cerevisiae* (W1). Crecimiento en mosto natural. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL frente a lo largo de vinificación. (A) Curva de viabilidad tomando el día 5 de crecimiento como 100% de viabilidad (B). Consumo de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (C). Las medidas se realizaron por triplicado. Se muestran la media y la desviación típica.

1.3.2 Papel del equilibrio nutricional y de la mitocondria en el control de la longevidad por Sch9p

Debido a la reducción significativa de la longevidad cronológica durante la fermentación en mosto natural causada por la delección de *SCH9*, se investigaron distintos factores que podrían estar mediando este comportamiento. Como se ha comentado en la Introducción, la fermentación en mosto natural difiere del crecimiento en medio mínimo en varios aspectos, entre ellos, y de forma particularmente relevante, en el bajo contenido en nitrógeno (113.2 mg/L de nitrógeno asimilable en MS300 y 76.4 mg/L en el mosto natural tempranillo empelado

en este trabajo) y alto contenido de azúcares en el medio, así como una baja cantidad de oxígeno que favorece la fermentación frente a la respiración, lo que sugería que era interesante ver el papel de la mitocondria en estas condiciones.

Para analizar la relevancia del nitrógeno en la longevidad del mutante *sch9Δ* se analizó su envejecimiento en un medio mínimo SC con 1/25 veces menos de nitrógeno en el medio, condición que emula la limitación de nitrógeno en el mosto natural. En la Figura 1.15 A se puede observar que el mutante *sch9Δ* tiene una longevidad cronológica menor que la cepa silvestre, lo que contrasta con lo que se había observado en el medio mínimo completo SC (Fig 1.7A). Este resultado apunta a que Sch9p es necesaria para la extensión de la longevidad cronológica en medios bajos en nitrógeno, ya sea medio mínimo o mosto de uva natural o sintético. Debido a esto, se podría explicar la caída en la longevidad cronológica del mutante *sch9Δ* en mosto y medio mínimo con 1/25 en nitrógeno (Figura 1.12 B y 1.15 A), así como la espectacular extensión de longevidad en medio mínimo completo (Figura 1.7A, 1.11A y 1.15B).

Se ha descrito que la inhibición de TORC1/Sch9p produce la extensión de la longevidad cronológica promoviendo la respiración en medio de laboratorio SC (Fabrizio et al., 2003; Lavoie and Whiteway, 2008; Pan et al., 2011). Para poder explicar el papel de la respiración en la extensión de la longevidad del mutante *sch9Δ*, se construyeron mutantes *petite*, *rho*, de la cepa vínica haploide C9 y de varios mutantes de interés, tal como se explica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos, que son incapaces de crecer en una fuente de carbono no fermentable, como es el glicerol. Estas cepas se cultivaron en medio mínimo completo SC y se obtuvieron las gráficas de viabilidad o supervivencia que se representa en la Figura 1.15 B. Las condiciones habituales con aireación favorecen el metabolismo respiratorio del etanol una vez fermentada toda la glucosa. La cepa C9 *petite rho* tiene una longevidad cronológica reducida, indicando que en estas condiciones, la función mitocondrial es necesaria para la longevidad. El mutante *sch9Δ* presentó la ya descrita longevidad cronológica incrementada, pero su versión *petite rho* mostró la misma longevidad cronológica que la cepa silvestre *petite*, resultado que confirma que la función mitocondrial es esencial para el papel de Sch9p en envejecimiento cronológico en condiciones estándar de laboratorio.

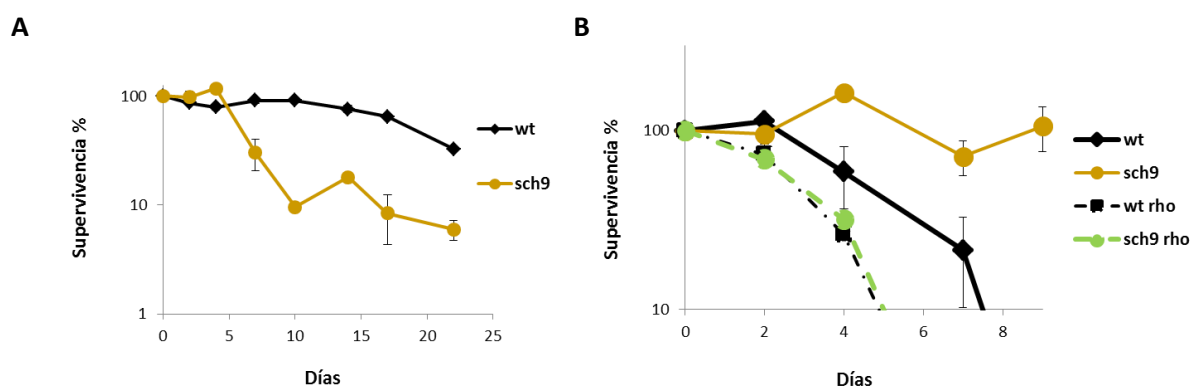


Figura 1.15 Curvas de supervivencia. Curvas de viabilidad de la cepa silvestre y del mutante *sch9Δ* así como de los mutantes *rho* en estas cepas en medio completo SC con 1/25 de nitrógeno. Se tomó el día 7 como 100% de viabilidad (**A**). Curva de longevidad cronológica en medio mínimo completo (SC) de cepas *rho* derivadas de las mismas cepas, donde se tomó el día 3 como 100% de viabilidad (**B**). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

A continuación, se realizaron fermentaciones de las cepas *petite* en mosto natural, cuyos parámetros se muestran en la Figura 1.16. En estas condiciones, la cepa C9 *rho* también tiene una muy ligera disminución en las unidades formadoras de colonia por mL. En el caso del mutante *sch9Δ*, la adición de la mutación *petite rho* supone un mayor efecto de descenso del crecimiento (panel A). En el panel B, se muestran las curvas de viabilidad tomando el día 3 como 100% de viabilidad, donde se observa que la cepa C9 *petite rho* tiene también reducida la longevidad cronológica. Por lo que, incluso en condiciones de metabolismo fermentativo, con gran concentración de azúcares, la mitocondria tiene un papel esencial en longevidad que podría ir más allá de su función estrictamente respiratoria.

La combinación de las mutaciones *petite* y *SCH9* no afecta aditivamente a la longevidad cronológica, lo que sugiere que ambas producen efectos sobre mecanismos relacionados y, por tanto, una relación funcional entre ellas. Aunque la velocidad en el consumo de azúcares de la cepa mutante *sch9Δ petite rho* es menor, es capaz de terminar de consumir los azúcares presentes en el mosto y de producir etanol de manera similar al silvestre, Figura 1.16 C y D. Así pues la mitocondria tiene cierto impacto en la proliferación celular pero solo ralentiza los procesos biotecnológicos de consumo de azúcares y producción de etanol, no los bloquea.

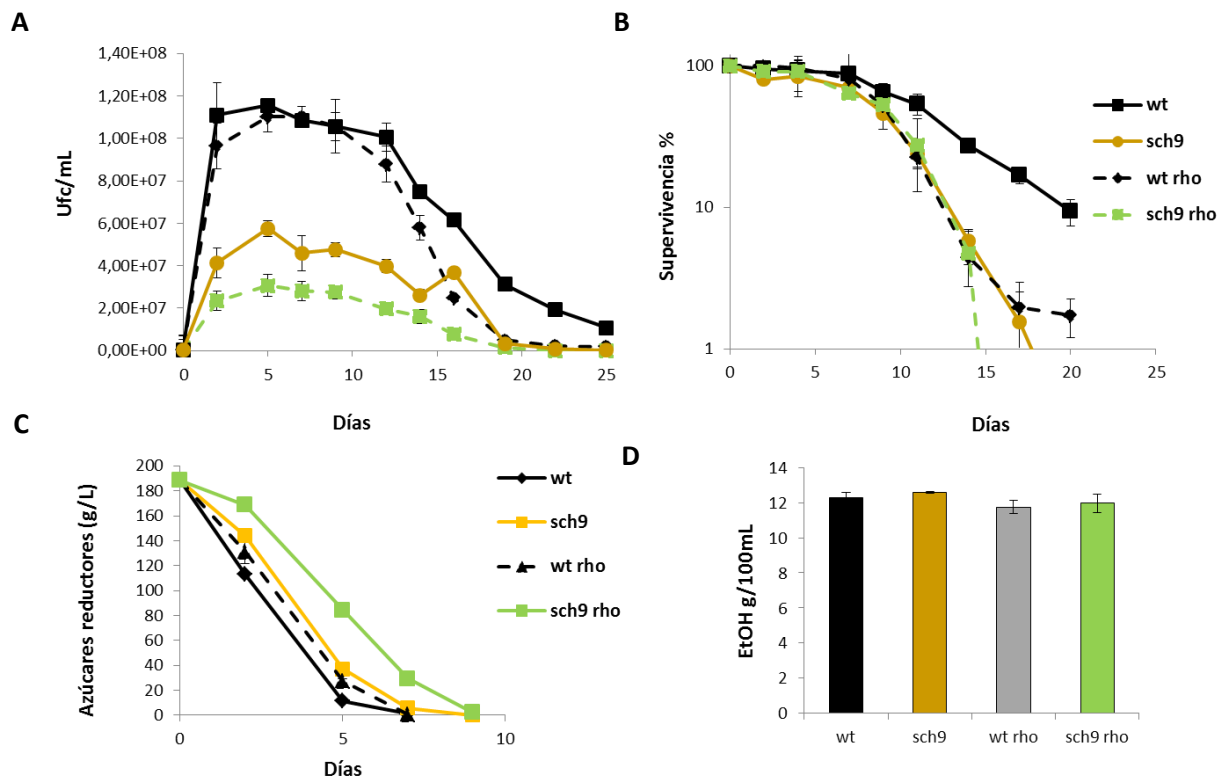


Figura 1.16 Curvas de crecimiento en mosto natural tempranillo de las cepas silvestre, mutante *sch9Δ* y de ambas con la mutación *rho*. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica tomando, el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad (B). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (C). Determinación de etanol al final del proceso de fermentación (D). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

1.3.3 Papel de la respuesta retrógrada en longevidad cronológica

Como se ha comentado en la Introducción, existe una comunicación entre la mitocondria y el núcleo que permite la rápida activación de genes de respuesta a estrés cuando se produce un daño en la mitocondria. Esta ruta se denomina Ruta de Respuesta Retrógrada e implica a bastantes proteínas, siendo Rtg2p el sensor de daño que permite el traslado de los factores de transcripción Rtg1/3p al núcleo, donde forman un complejo transcripcional, muy similar a SAGA, llamado SLIK (Saga- LIKe) que provoca la activación transcripcional de genes de respuesta a estrés. Además, parece que hay una conexión entre Rtg2p, la ruta TORC1/Sch9p y el complejo transcripcional SAGA (Jazwinski, 2005; Pray-Grant et al., 2002; Torelli et al., 2015). Como se ha comprobado en los experimentos anteriormente mostrados, la función mitocondrial juega un papel en la extensión de la longevidad observada en el mutante *sch9Δ* en medio mínimo completo. Para investigar la posible implicación de la respuesta retrógrada en dicho papel, se construyeron los mutantes simple *rtg2Δ* y el doble *rtg2Δsch9Δ*.

Resultados y discusión

En la Figura 1.17 se representa la viabilidad de las cepas en medio SC tomando como 100% de viabilidad el día 3 de crecimiento. Como en todos los experimentos en estas condiciones, se observa una gran extensión de longevidad cronológica del mutante *sch9Δ*. La LC del mutante *rtg2Δ* es mucho más corta que la de la cepa silvestre, mientras que el doble mutante *rtg2Δsch9Δ* presenta longevidad extendida, casi tanto como la del mutante simple *sch9Δ*. Estos resultados sugieren que la respuesta retrógrada está implicada en la longevidad y que sus efectos requieren la función de Sch9p, que parece estar *downstream* de la misma.

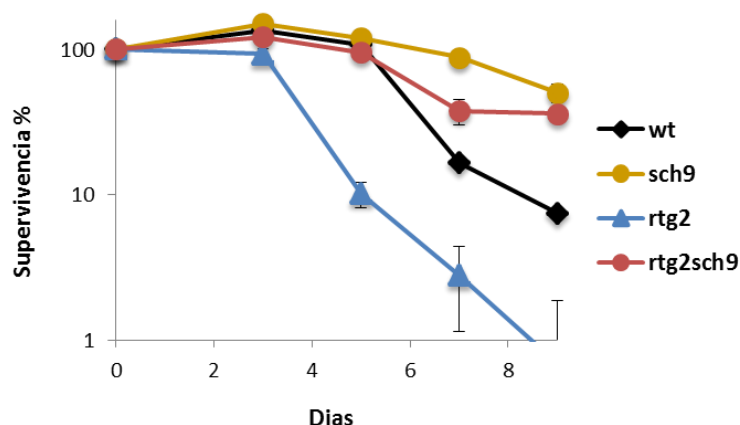


Figura 1.17 Conexión Ruta de Respuesta Retrógrada y SCH9. Curva de longevidad cronológica del silvestre, *sch9Δ*, *rtg2Δ* y *rtg2Δsch9Δ* en medio SC, tomando el día 3 de crecimiento es como 100% de viabilidad. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Para estudiar si este comportamiento también ocurre en condiciones de fermentación vínica, se realizaron crecimientos de estas cepas en mosto natural de la variedad tempranillo y se determinaron los parámetros de interés de la fermentación, tal como se representa en la Figura 1.18. El mutante *rtg2Δ* presenta crecimiento (panel A), consumo de azúcares (panel B) y LC (panel C) muy similares a los de la cepa silvestre, sugiriendo que la respuesta retrógrada no es relevante en estas condiciones, fundamentalmente fermentativas. En cuanto a la LC, (panel C), se observa que el mutante *rtg2Δ* tiene una pequeña extensión de la longevidad con respecto a la cepa silvestre, sobre todo a tiempos más avanzados de vinificación, efecto que aunque muy ligero, es contrario de lo que ocurre en el medio SC donde este mutante presenta una evidente reducción de su LC (Fig 1.17). En cuanto al doble mutante, *rtg2Δsch9Δ*, se observa una disminución de todos los fenotipos característicos de la delección de *SCH9*, tanto en crecimiento, como en LC y en perfil de consumo de azúcares, aunque sigue predominando la tendencia impuesta por dicha mutación.

El análisis conjunto del comportamiento en los dos medios ensayados, medio mínimo completo SC y mosto natural, muestra que existe interacción genética entre los mutantes *sch9Δ* y *rtg2Δ*, interacción que genera fenotipos intermedios entre los de ambos mutantes simples, tanto en el crecimiento como en el consumo de azúcares en mosto. Sin embargo en el caso del fenotipo de envejecimiento, tanto en la fermentación en mosto natural como en el cultivo en SC, la LC del doble mutante cae prácticamente igual que en el mutante simple *sch9Δ*, lo que lleva a concluir que los efectos de Sch9p operan a través de otros mecanismos independientes de la respuesta retrógrada o que se encuentra *downstream* de la misma.

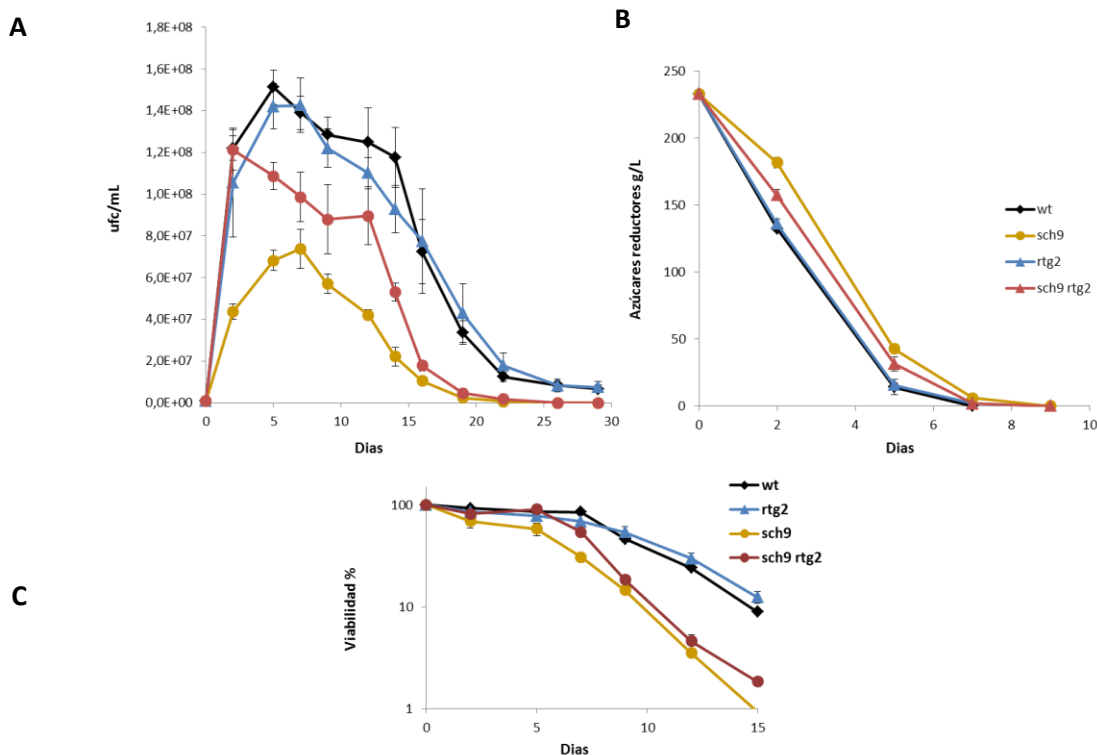


Figura 1.18 Curvas de crecimiento y viabilidad durante la fermentación en mosto natural entre la conexión *SCH9* y *RTG2*. Curva de crecimiento en mosto natural tempranillo. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (B). Curva de longevidad cronológica donde el día 5 de crecimiento de la gráfica A es tomado como 100% de viabilidad (C). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Debido al papel de la función mitocondrial en la extensión de la LC observada en medio mínimo completo SC en el mutante *sch9Δ* (Fig 1.15) se construyeron mutantes simples *petite rho* y *rtg2Δ* y el doble mutante en la cepa C9 y se estudió la relación entre estos dos mecanismos distintos implicados en la función mitocondrial.

Resultados y discusión

En la Figura 1.19 A se observa el crecimiento del mutante *rtg2Δ* en un fondo genético silvestre y en un fondo genético con pérdida de función mitocondrial, *rtg2Δ rho*. Hay diferencias en el crecimiento ya que se aprecia un mayor crecimiento de la cepa mutante *rtg2Δ* y no de *rtg2Δ rho* pero estas diferencias no son significativas. Tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad, se obtuvieron las curvas de supervivencia que se muestran en el panel B, en las que se puede observar que la delección de *RTG2* extiende muy ligeramente la longevidad cronológica en condiciones de fermentación en mosto natural y, esta extensión se ve bloqueada como consecuencia de la inactivación de la mitocondria. Los paneles C y D muestran el consumo de azúcares y la producción de etanol al final de la fermentación en mosto natural, parámetros que no se ven significativamente afectados por las mutaciones analizadas.

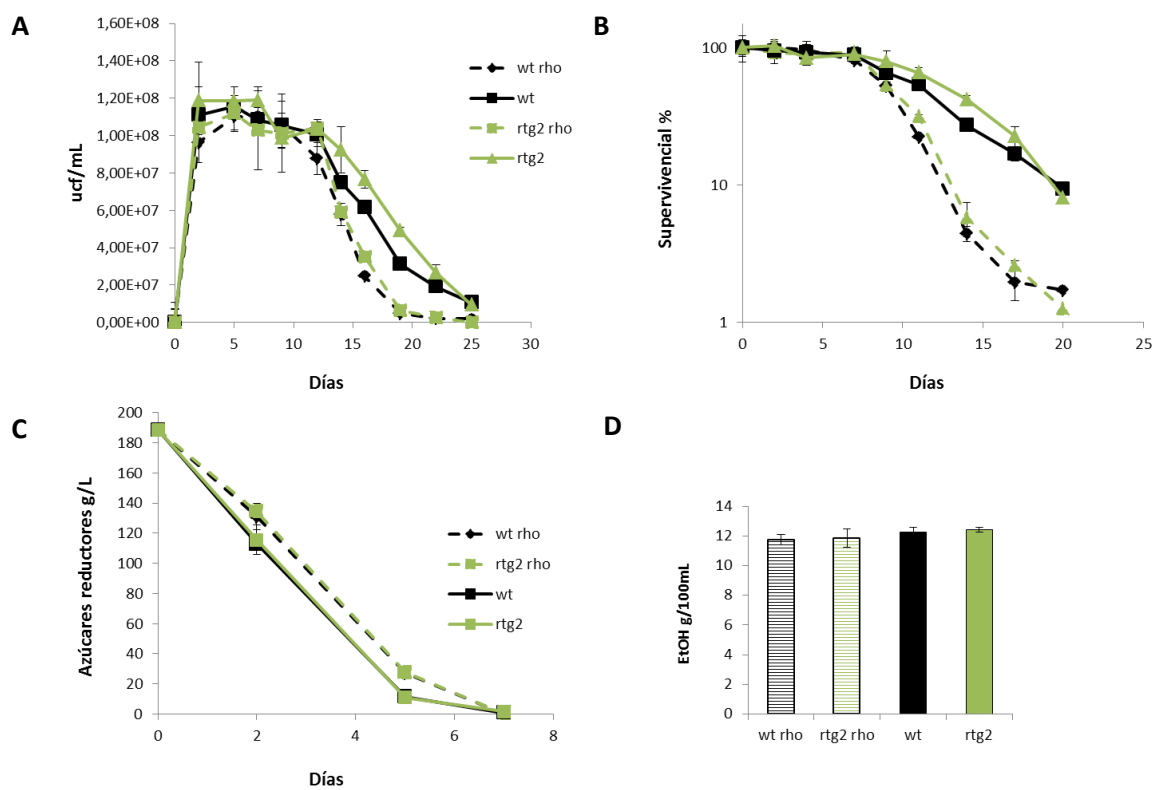


Figura 1.19 Estudio del comportamiento de mutantes *rho* y *rtg2Δ* y fermentación en mosto natural. Curvas de crecimiento de las cepas silvestre, mutante *rtg2Δ* y las cepas combinadas con la mutación *rho*. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempos de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica tomando el día 3 de crecimiento de la gráfica A es tomado como 100% de viabilidad (B). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (C). Determinación de etanol al final del proceso de fermentación (D). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

En los análisis en conjunto de todos los experimentos con los mutantes *rtg2Δ* y *rho* se puede concluir que efectivamente la función mitocondrial tiene un papel importante en la LC poniendo además en evidencia importantes diferencias en el papel de ambos mecanismos estudiados. En condiciones de vinificación en mosto natural, es la actividad respiratoria, y no la respuesta retrógrada la que juega un papel relevante, aun cuando en esas condiciones el metabolismo es, mayoritariamente, fermentativo. Esto puede deberse a la necesidad permanente de una cierta tasa de respiración para el funcionamiento de determinadas rutas metabólicas celulares esenciales. Sin embargo, ambos mutantes simples presentan LC reducida en condiciones de envejecimiento en medio mínimo completo SC con aireación (Fig 1.15B y 1.17), donde las células están en un estado metabólico respiratorio, y donde probablemente no solo la propia actividad respiratoria es necesaria, sino también la comunicación mitocondria-núcleo que permita inducir mecanismos protectores del daño oxidativo mitocondrial.

Se realizó un ensayo de envejecimiento cronológico en medio SC con estas cepas para poder estudiar el papel de la mitocondria en la respuesta retrógrada. Como se observa en la Figura 1.20, el mutante *rtg2Δ* no altera de manera drástica la longevidad, sugiriendo que no hay una activación relevante o determinante de la respuesta retrógrada en estas condiciones. Cuando la célula tiene una mitocondria no funcional, la disrupción de *RTG2* sorprendentemente no causa una caída adicional de longevidad, sugiriendo la actividad compensadora de otras rutas.

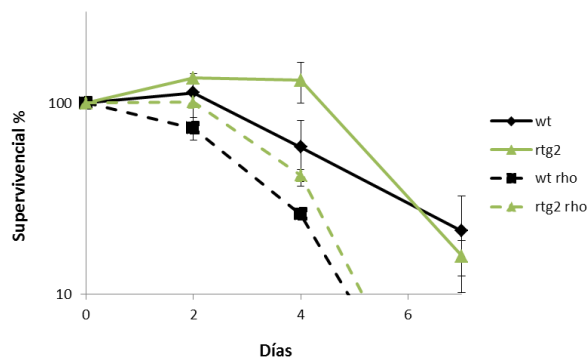


Figura 1.20 Curvas de crecimiento y muerte celular del mutante en *RTG2* y las cepas *rho* en la cepa silvestre C9 y en el mutante *rtg2Δ*. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Como se ha comentado previamente, en nuestro laboratorio se ha descrito el papel de *GCN5* en la longevidad en fermentación en mosto bobal, que la extiende al ser mutada, mientras que en condiciones de envejecimiento en medio mínimo en el mutante de delección de *GCN5* la longevidad se ve reducida. Debido a ello, decidimos estudiar el papel de la mitocondria en la extensión de la longevidad en el mutante *gcn5Δ* en condiciones de fermentación en mosto natural de la variedad tempranillo.

Resultados y discusión

Como se puede observar en la gráfica que representa el crecimiento en unidades formadoras de colonia por mL en la Figura 1.21 A, tanto el mutante *gcn5* Δ como su versión *rho*, tienen un crecimiento menor siendo el de *gcn5* Δ *rho* ligeramente mayor que el mutante con la mitocondria funcional. Como se muestra en la Figura 1.21 B, *gcn5* Δ presenta diferencias en la longevidad cronológica en condiciones de fermentación en el mismo sentido independientemente del estado de la mitocondria, por lo que no hay interacción entre ambos factores.

Se midió el consumo de azúcares a lo largo de todo el proceso fermentativo así como la producción de etanol al final de la fermentación y como se puede observar en la Figura 1.21 C y D respectivamente, no hay diferencias significativas en el consumo de azúcares aunque se ve una disminución en la velocidad del consumo de los azúcares en los mutantes con respecto al silvestre/parental, pero ambas cepas, son capaces de producir, al final de la fermentación, similar concentración de etanol que el silvestre.

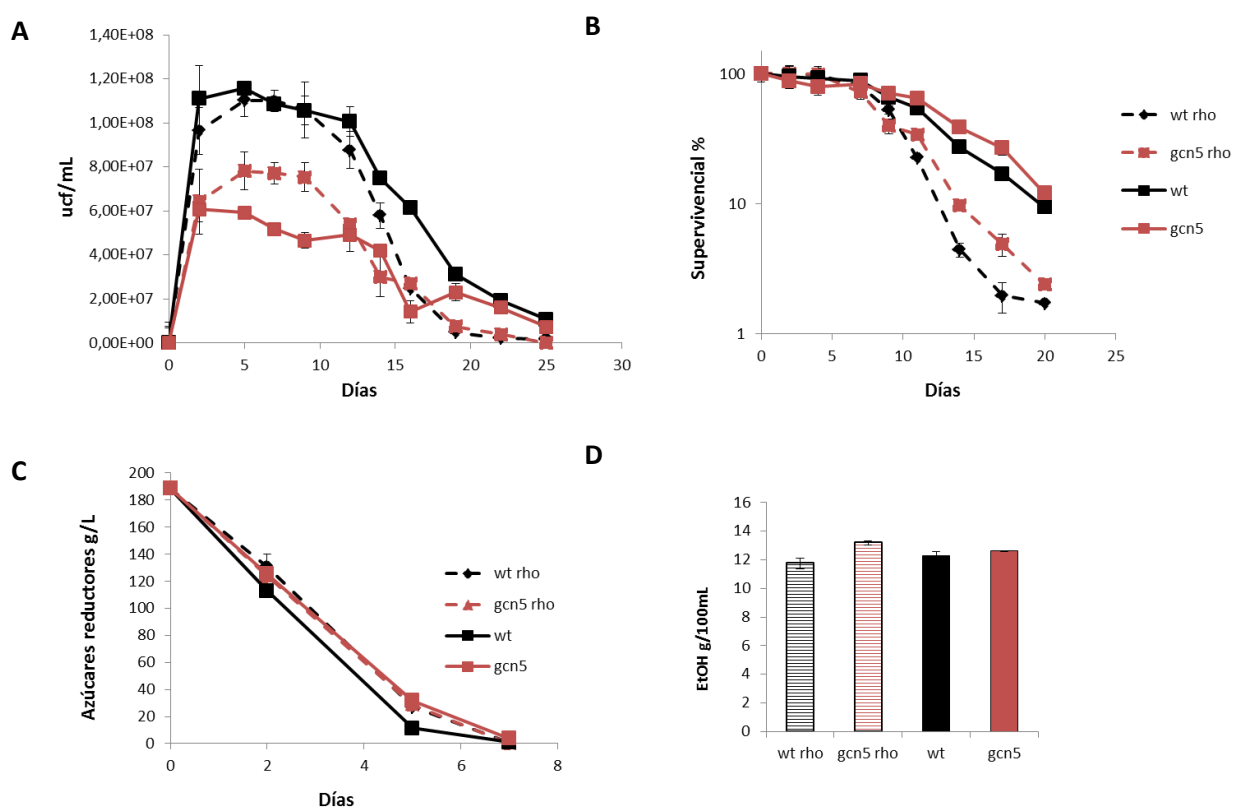


Figura 1.21 Curva de crecimiento del silvestre y del mutante *gcn5* Δ y las mismas cepas *rho* en mosto natural. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica, el día 5 de crecimiento de la gráfica A es tomado como el 100% de viabilidad (B). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (C). Determinación de etanol al final del proceso de fermentación (D). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

1.3.3.1 Conexión de *GCN5* y *RTG2* y su papel en longevidad cronológica

El complejo SLIK (Saga-LIKe) contiene las proteínas Gcn5p, Ubp8p y Spt20p comunes al complejo SAGA pero se diferencia de este por la presencia de Rtg2p. Por esta razón, se decidió estudiar la posible interacción genética entre Gcn5p y Rtg2p en relación con la longevidad cronológica. Se deletó el gen *RTG2* en el mutante *gcn5Δ* y se realizaron experimentos de longevidad cronológica tanto en medio mínimo completo SC como en mosto natural, cuyos resultados se muestran en la Figura 1.23 donde muestran las curvas de supervivencia de las cepas en estudio. Como se ha visto en experimentos anteriores con los mutantes simples (Figura 1.1, 11.7 y 1.11 para *gcn5Δ* y Fig 1.17 para *rtg2Δ*), la longevidad cronológica de ambos es menor que la longevidad de la cepa silvestre, siendo más acusada la caída de LC en el mutante *rtg2Δ* que en el mutante *gcn5Δ*. Cuando se combinan ambas deletaciones se observa un efecto aditivo, de manera que el doble mutante presenta una caída de LC mucho más pronunciada que los mutantes simples. Este efecto aditivo sugiere que estas dos proteínas, además de ser constituyentes del complejo SLIK, a través del cual comparten función en determinados mecanismos reguladores, participan también en rutas adicionales que afectan a la longevidad cronológica.

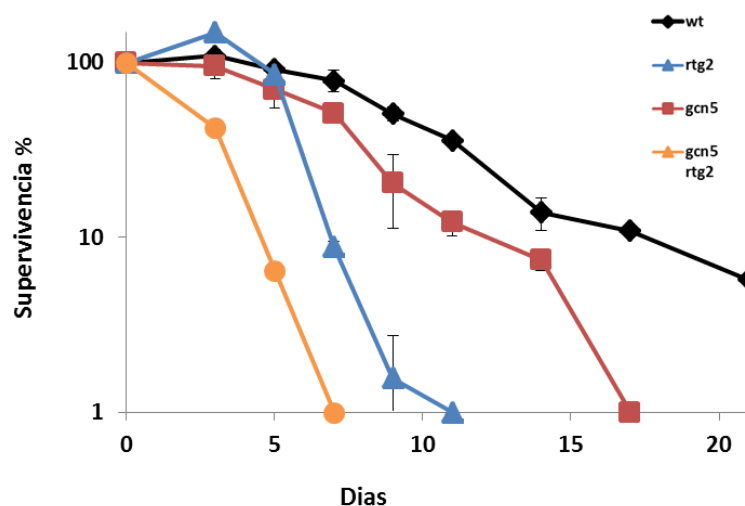


Figura 1.23 Efecto de la delección de *RTG2* y *GCN5* en longevidad cronológica. Experimentos de longevidad cronológica en la cepa haploide vínica industrial C9 y en los mutantes simples *gcn5Δ*, *rtg2Δ* y doble *gcn5Δrtg2Δ* en medio mínimo completo (SC). Se representó la supervivencia en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Se realizaron a continuación experimentos de fermentación en mosto natural, con los resultados que se muestran en la Figura 1.24 y que ratifican el efecto aditivo de las mutaciones en los genes *GCN5* y *RTG2*.

Resultados y discusión

Los perfiles de crecimiento del panel A indican que no hay diferencias significativas entre los mutantes simples y la cepa silvestre, sin embargo si que se observa diferencias significativas en el crecimiento del doble mutante, que presenta un menor crecimiento. Tomando el día 5 de crecimiento como 100%, obtenemos las gráficas de viabilidad mostradas en el panel B, donde los mutantes simples muestran una ligera pero significativa extensión de la longevidad cronológica, sobre todo al final del proceso fermentativo, y la extensión en el doble mutante es mayor que la de los mutantes simples, concluyendo que, en estas condiciones de metabolismo predominantemente fermentativo también hay un efecto aditivo positivo en el efecto de las deleciones de *RTG2* y *GCN5* en la LC (Figura 1.24 B).

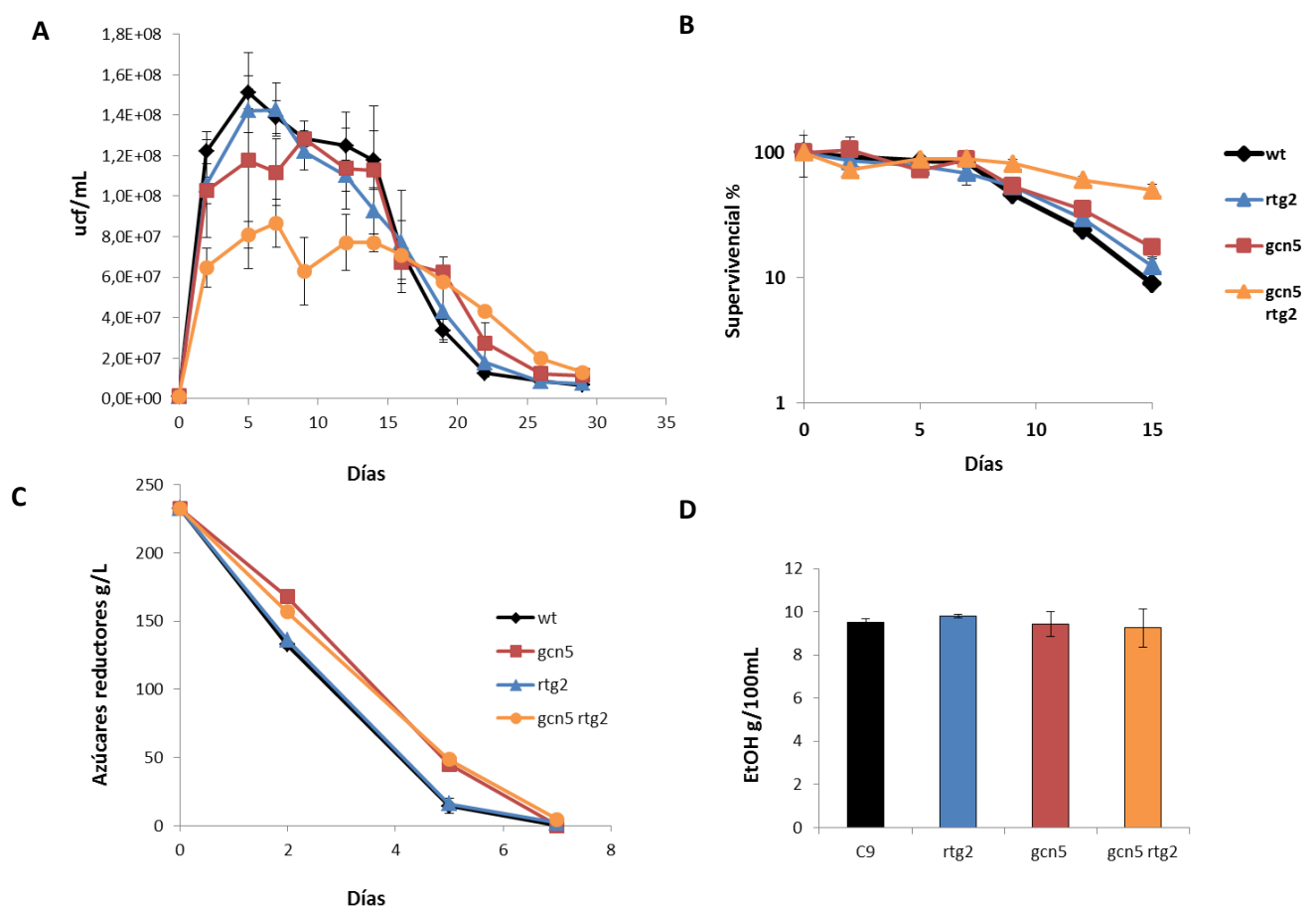


Figura 1.22 Conexión de *RTG2* y *GCN5* en vinificación en mosto natural. Curva de crecimiento de los mutantes *gcn5* Δ , *rtg2* Δ y doble mutante *gcn5* Δ *rtg2* Δ . Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica, tomando el día 5 de crecimiento de la gráfica A como 100% de viabilidad (B). Determinación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (C). Determinación de etanol al final del proceso de fermentación (D). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

En cuanto al estado metabólico, y como también se observó en experimentos anteriores con los mutantes simples, hay que destacar que a pesar de que las fermentaciones de los mutantes *gcn5Δ* y doble presentan un consumo de azúcares más lento, explicable por su menor densidad celular, son capaces de terminar de fermentarlos, Figura 1.24C, así como producir concentraciones de etanol al final de la fermentación similares a la cepa silvestre, Figura 1.24 D.

1.3.3.2 Ruta de control general de aminoácidos y su relación con Rtg2p en longevidad

Se ha descrito que los cambios observados en la expresión génica durante la limitación de glucosa y durante la limitación de aminoácidos no esenciales (limitación de nitrógeno) producen una inducción del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) así como de los genes de respuesta retrógrada. Debido al papel que tiene la ruta GAAC en la activación de genes de respuesta a condiciones de ayuno de nitrógeno así como a su conexión con la ruta TORC1/Sch9p y su papel en la LC (Vallejo et al., 2016), se analizó el posible papel de la ruta retrógrada a través de la ruta del control general de aminoácidos como consecuencia de ayuno de nitrógeno. Para ello, se deletó el gen *GCN2* en la cepa haploide C9 así como en el mutante *rtg2Δ*.

En la Figura 1.23 se muestran las curvas de viabilidad de estas cepas en experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC. En el mutante *gcn2Δ* tiene una extensión de la longevidad cronológica media. La longevidad cronológica de *rtg2Δ* es menor que la del silvestre y sin embargo, el doble mutante presenta una recuperación de la longevidad respecto de la del mutante más afectado *rtg2Δ*, dando lugar a un fenotipo intermedio. Esto nos indica funciones contrapuesta en longevidad en un medio rico en aminoácidos, pero no se puede asegurar de que ambos funciones a través de la misma ruta.

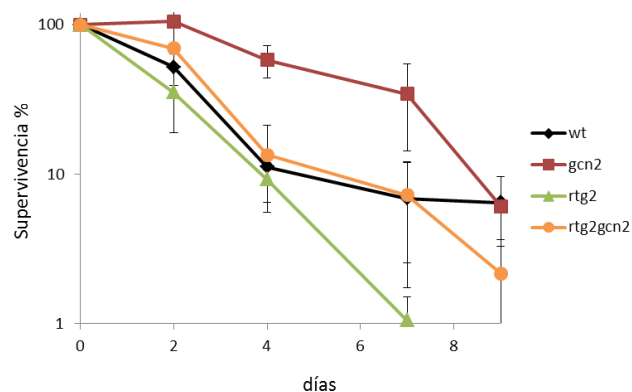


Figura 1.23 Conexión de la ruta de respuesta retrógrada y el control general de aminoácidos. Experimentos de longevidad cronológica en medio mínimo completo SC. Se tomó el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad y se representó la supervivencia en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Un elemento clave en la regulación de la respuesta retrógrada es la interacción entre Rtg2p y Mks1p, un inhibidor o regulador negativo de la misma, que actúa a nivel de fosforilación de Rtg3p, evitando su translocación al núcleo. Mks1p se une de manera reversible a Rtg2p. Por ello, se construyó el mutante *mks1Δ* en la cepa C9 así como en el mutante *gcn2Δ*, con el fin de investigar su interacción en las distintas condiciones de envejecimiento y compararla con Rtg2p. En la Figura 1.24 se muestran las curvas de supervivencia en medio mínimo completo SC en estas cepas, donde se ve que, tanto los mutantes simples como el doble mutante, presentan una extensión de la longevidad cronológica pero no de forma aditiva, lo que indica, que en condiciones de metabolismo fundamentalmente respiratorio, tanto Gcn2p como Mks1p están regulando la extensión de la longevidad cronológica por mecanismos similares. Si comparamos estos resultados con los obtenidos con la delección de *RTG2* podemos sacar varias conclusiones, por un lado, al eliminar el inhibidor de la ruta de respuesta retrógrada, Mks1p, Rtg2p estaría activo y podría fosforilar a Rtg3p e iniciar el traslado al núcleo de los factores transcripcionales Rtg1/3p y esto produciría una extensión de la LC. En el caso del mutante en *RTG2* se observa lo contrario, hay una reducción de la LC. También se observa que en la combinación con *GCN2*, en el caso de *RTG2* hay una pequeña extensión de la LC con respecto a *rtg2Δ* o una disminución de la LC con respecto a *gcn2Δ* (Figura 1.23), mientras que en combinación con *MKS1* no se comporta mejor que con los simples (Figura 1.24).

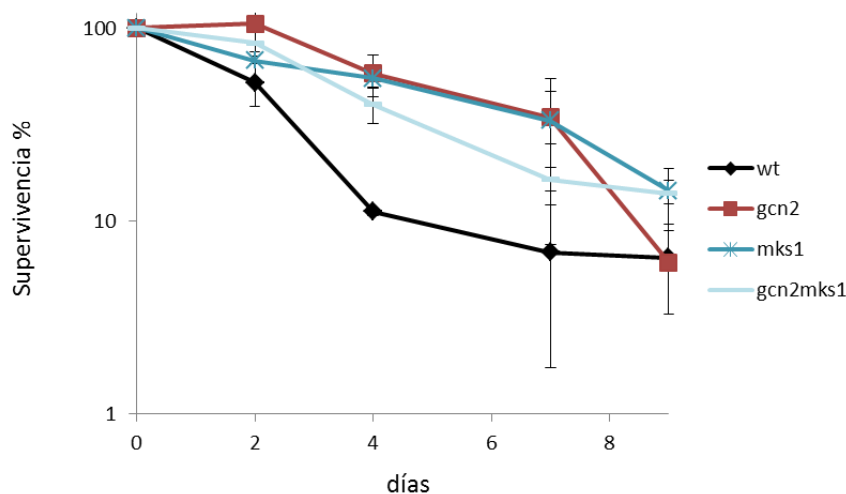


Figura 1.24 Conexión de la ruta de respuesta retrógrada y el control general de aminoácidos. Experimentos de longevidad cronológica en medio mínimo completo SC. Se tomó el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad y se representó la supervivencia en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Las condiciones ambientales durante la fase de crecimiento de *S. cerevisiae* determinan el destino de las células en la fase de muerte. El ejemplo más estudiado es que el crecimiento en un medio con un contenido en nutrientes reducido que provoca un ayuno a las células, extiende la longevidad.

Las levaduras vínicas industriales son protótrofas por lo que, son capaces de crecer con amonio o con cualquiera de los veinte aminoácidos como única fuente de nitrógeno por lo que, podemos observar una extensión en la LC reduciendo tanto el amonio como los aminoácidos como ocurre en condiciones de vinificación. Los reguladores clave de la LC en respuesta a los nutrientes son las rutas de señalización de nutrientes. En este capítulo se describen componentes de rutas de señalización de nutrientes y otras rutas que participan en la regulación de la LC en función del medio. Otros factores afectan a la longevidad independientemente de las condiciones ambientales. Por ejemplo, la delección del gen *SPT20* perteneciente al módulo estructural del complejo SAGA bloquea la autofagia (Figura 1.2) pero sin embargo, tiene una LC reducida tanto en medio SC y SC con 1/25 N (Figura 1.1) así como en mosto (Figuras 1.4 y 1.5) que podría explicarse por el defecto de este mutante en la respiración del glicerol y en la respuesta al ayuno de aminoácidos de la familia de la leucina (Figura 1.6). El mutante en *UBP8* perteneciente al módulo de desubiquitinización del complejo SAGA tiene un bloqueo parcial de la autofagia (Figura 1.2) y una reducción de su longevidad cronológica (Figuras 1.1, 1.4 y 1.5) aunque no muestra defecto claro en crecimiento en condiciones respiratorias ni en ayuno de los aminoácidos ensayados (Figura 1.6).

Se ha visto que Gcn5p, acetiltransferasa del complejo SAGA y SLIK (entre otros), tiene una relación con la ruta de señalización TORC1/Sch9p. La mutación de *GCN5* impide, al menos parcialmente, la extensión de la LC en medio SC de los mutantes de delección de los genes *SCH9* y *TOR1* (Figura 1.7). Esto sugiere que los cambios en la expresión génica causados por la ruta TORC1/Sch9p ocurren, al menos en parte, a través del complejo SAGA. Durante la fermentación en mosto, el doble mutante *gcn5Δsch9Δ* mostró una LC reducida similar a la del mutante en *SCH9* lo que sugiere que el papel de SAGA en la expresión génica también depende de las condiciones de crecimiento. Se ha estudiado la relación entre Gcn5p y Sch9p a través de Rgm1p. A pesar de que *RGM1* parece no tener un impacto en la LC durante el crecimiento normal, parece ser importante en la LC en condiciones de ayuno de nitrógeno, lo que es similar a *SCH9* (Figura 1.12).

En este capítulo también se describe el papel de la mitocondria en la LC desde diferentes frentes de estudio. Por un lado, se observó que la mitocondria de *S. cerevisiae* dotaba de una mayor resistencia al estrés oxidativo y una mayor LC a la levadura que la porta, a través del uso de híbridos interespecíficos entre estas dos especies (Figuras 1.13 y 1.14), pero solo en medios donde la respiración es relevante para producir energía. Otras proteínas de rutas relacionadas que se describen con papeles opuestos en la LC en función del medio de crecimiento es la ruta de respuesta retrógrada que es un mecanismo de comunicación entre la mitocondria y el núcleo siendo Rtg2p el componente esencial de la ruta y su delección en levaduras vínicas produce una disminución en la LC en el medio SC, lo que es comprensible por la necesidad de respirar cuando se ha consumido la glucosa del medio (Figura 1.17) sin

Resultados y discusión

embargo, en condiciones de vinificación el mutante *rtg2Δ* presenta un pequeño incremento en la LC (Figura 1. 18) .

Esta versión simplificada de la función mitocondrial no ofrece una explicación de cómo las cepas *petite* que son incapaces de respirar tienen un defecto en la LC tanto en medio SC como en fermentación en mosto.

Si se compara el comportamiento de los mutantes *petite* con la delección de *RTG2* sugiere que la integridad de la mitocondria y/o funciones metabólicas a parte de la respiración son relevantes para la extensión completa de la longevidad durante fermentación ya que no se observa un defecto claro por la pérdida de la señalización mitocondria-núcleo.

Por otro lado, el defecto en la LC del mutante de delección en *SCH9* en vinificación es llamativo (Figuras 1.12) y no se ajusta al papel aceptado de las rutas sensibles a nutrientes durante el envejecimiento. En medio SC se ha visto la extensión esperada de la longevidad del mutante *sch9Δ* y se ha sugerido que esta extensión puede ser debido a un aumento en la frecuencia de la respiración. Nuestros resultados mediante el uso de cepas *petite* en el silvestre y en el mutante *sch9Δ* confirma este hecho (Figura 1.16). La composición específica de los medios, como el ratio: alta fuente de carbono/ pobre fuente de nitrógeno del mosto, puede estar detrás de estas discrepancias. La disminución de longevidad del mutante *sch9Δ* en medio con nitrógeno reducido avala esta hipótesis. Así pues se puede concluir que los desequilibrios nutricionales pueden ser más relevantes para la longevidad que la abundancia absoluta de uno u otro nutriente. Otros autores han sugerido de forma similar que en un mosto sintético con alto contenido en nitrógeno y bajo en lípidos la delección de *SCH9* extiende la longevidad cronológica (Tesnière et al., 2013). En mosto o en medio SC con bajo nitrógeno, los bajos niveles de aminoácidos pueden comprometer la síntesis proteica, promovida por Sch9p. Esa disminución de la traducción puede ser limitante cuando los azúcares son abundantes y la respiración es irrelevante. Esto podría explicar por qué el doble mutante *sch9Δrtg2Δ* se parece más al mutante *sch9Δ* (LC corta) que al mutante *rtg2Δ* (LC extendida) en condiciones de vinificación.

En conclusión, la LC está regulada por diferentes rutas de señalización de nutrientes así como por la función de la mitocondria y que esta regulación, depende del medio de cultivo, es decir, de la disponibilidad de nutrientes y del metabolismo que ocurra en cada uno de ellos.

CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE LA CONEXIÓN ENTRE TSA1 Y GCN2 EN LONGEVIDAD CRONOLÓGICA

Como ya se ha comentado en la Introducción, *S. cerevisiae* tiene cinco peroxirredoxinas en diferentes localizaciones celulares: Tsa1p, Tsa2p, Ahp1p son citosólicas, una es mitocondrial, Prx1p, y por último hay una nuclear llamada Dot5p. La peroxirredoxina mitocondrial es la única monotiólica, el resto son del tipo 2-Cys. Las cinco peroxirredoxinas tienen actividad tiorredoxina reductasa, siendo Tsa1p la peroxirredoxina más abundante en la célula y con mayor actividad. Tsa1p y Tsa2p presentan actividad peroxinitrito reductasa, lo cual se correlaciona con su posible papel en la defensa frente al estrés nitrosativo. Está bastante claro, que Tsa1p y Tsa2p actúan cooperativamente, tanto frente al estrés oxidativo como nitrosativo, y que esta cooperación se puede extender a las otras tres peroxirredoxinas como un mecanismo compensatorio en el que también habría que incluir los sistemas dependientes de glutatión. Además Tsa1p posee un papel como chaperona (Jang et al., 2004). Este papel podría proteger frente a la acumulación de proteínas mal plegadas bajo condiciones de estrés en una función chaperona que, en el caso de Tsa1p, se ha demostrado que es independiente de su actividad peroxidática (Jang et al., 2004), aunque el estado de oxidación de Tsa1p condiciona su función de chaperona.

Gcn2p es una proteína quinasa clave en la ruta general de control de aminoácidos (GAAC). Cuando las células están bajo estrés nutricional, se acumulan tRNAs no cargados que sirven de señal para la activación de Gcn2p, responsable de la fosforilación e inactivación del factor de iniciación de la traducción eucariota eIF2- α . La fosforilación del eIF2 α también permite la traducción del mRNA de *GCN4*, que codifica para un activador transcripcional de un gran número de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos (Dever, 2002). *S. cerevisiae* tiene una única quinasa de eIF2- α , que es Gcn2p, mientras que en células de mamífero se han descrito quinasas adicionales que responden a diferentes ambientes estresantes (Conrad et al., 2014; Lageix et al., 2014; Wek et al., 2006). Se ha estudiado la potente conexión entre el GAAC y otras rutas reguladoras de respuesta a nutrientes y de control de la división y crecimiento, como la ruta TORC1 y PKA (Cherkasova and Hinnebusch, 2003; Conrad et al., 2014; Staschke et al., 2010). Por un lado se ha descrito que la activación de Gcn2p está influenciada por *TOR1* (Wengrod et al., 2015) y que la inhibición de mTORC1 permite la activación de Gcn2p y la fosforilación de eIF2- α en un mecanismo dependiente de la fosfatasa PP6C en eucariotas superiores. En levaduras, se ha visto que TORC1 podría inhibir directamente a Gcn2p vía fosforilación del residuo de serina Ser577. Recientemente se ha descrito que TORC1 es a su vez una diana directa de la proteína quinasa Gcn2p en respuesta al ayuno de aminoácidos a través de la fosforilación de Kog1p (la única subunidad reguladora de TORC1) (Yuan et al., 2017b).

Entre los procesos controlados a través de la bajada general de traducción que ocasiona la fosforilación de eIF2- α mediada por la quinasa Gcn2p se encuentra también la regulación a nivel de traducción de la sulfirredoxina Srx1p (Molin et al., 2011), que bajo condiciones de estrés oxidativo contribuye a la resistencia celular reduciendo los grupos sulfínicos de la cisteína peroxidática C48 de la peroxirredoxina Tsa1p, permitiéndole así recuperar su capacidad catalítica (Biteau et al., 2003).

En condiciones de restricción dietaria, la inactivación de PKA alivia la inhibición, mediada por Gcn2p, de la traducción del mRNA de *SRX1* lo que provoca un aumento de los niveles de Srx1p y, como consecuencia una más eficiente recuperación el estado reducido, activo de la peroxiredoxina Tsa1p, lo que tiene efectos de extensión de la longevidad replicativa y de mayor tolerancia a estrés oxidativo en esas condiciones.

2.1 Conexiones entre la protein quinasa Gcn2p y las peroxirredoxinas en longevidad cronológica

2.1.1 Estudio de la longevidad cronológica en mutantes de *TSA1* y *GCN2*

Debido a la conexión entre la restricción calórica, los niveles de Srx1p controlados por Gcn2p, la actividad de Tsa1p y su implicación en la longevidad replicativa, se decidió estudiar la relación entre *TSA1* y *GCN2* en cepas vínicas, analizando su interacción en varias condiciones de crecimiento. Para ello se construyeron mutantes de delección en la cepa C9 en *TSA1* y *GCN2* así como el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* y se realizaron ensayos de envejecimiento cronológico.

En la Figura 2.1A se muestran las curvas de supervivencia de los mutantes *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* en medio mínimo completo SC. Como se observa, el mutante *tsa1Δ* presenta una menor longevidad cronológica que la cepa silvestre. Se ha descrito que la pérdida de Tsa1p produce agregación de proteínas que son sensibles al choque térmico y que esta acumulación de agregados se incrementa en respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂, incrementándose también el daño en el DNA y la inestabilidad genómica (Weids and Grant, 2014). Todas estas razones pueden contribuir a la menor LC del mutante *tsa1Δ*. El mutante *gcn2Δ* tiene una extensión de la longevidad cronológica que solo se observa en el último punto analizado, a día 7 de envejecimiento y que podría ser explicada por una mejor adaptación al medio. Si se elimina Gcn2p, no se produce la fosforilación de eIF2α, ya que es la única quinasa de este factor de iniciación de la traducción en *S. cerevisiae*. En esas condiciones, no se podría parar la traducción, lo que parecería otorgar cierta ventaja a tiempos largos. La longevidad cronológica del doble mutante de *gcn2Δtsa1Δ* está muy reducida comparada tanto con la cepa silvestre como con los mutantes simples, reflejando una interacción genética fuerte entre *GCN2* y *TSA1*.

Para estudiar si esta conexión era dependiente de la disponibilidad de nitrógeno, se realizó un ensayo de envejecimiento cronológico en un medio mínimo completo SC con 1/25 de nitrógeno asimilable, lo que provoca una restricción de nitrógeno sin inducir malnutrición, llamado restricción dietaria. En estas condiciones (Figura 2.1B) *tsa1Δ* mantiene la menor viabilidad ya observada en medio SC, en cambio, el mutante *gcn2Δ* tiene una longevidad cronológica en este medio un poco menor que el silvestre y no se observa la extensión en el tiempo final del experimento.

La dramática reducción de la LC en el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* también se produce en este medio con una importante limitación de nitrógeno, que debería activar mecanismos alternativos frente a este tipo de ayuno. Esto sugiere que dicha interacción puede estar más vinculada al metabolismo del carbono, al metabolismo respiratorio que se produce en ese medio o a las condiciones de quiescencia impuestas en fase estacionaria.

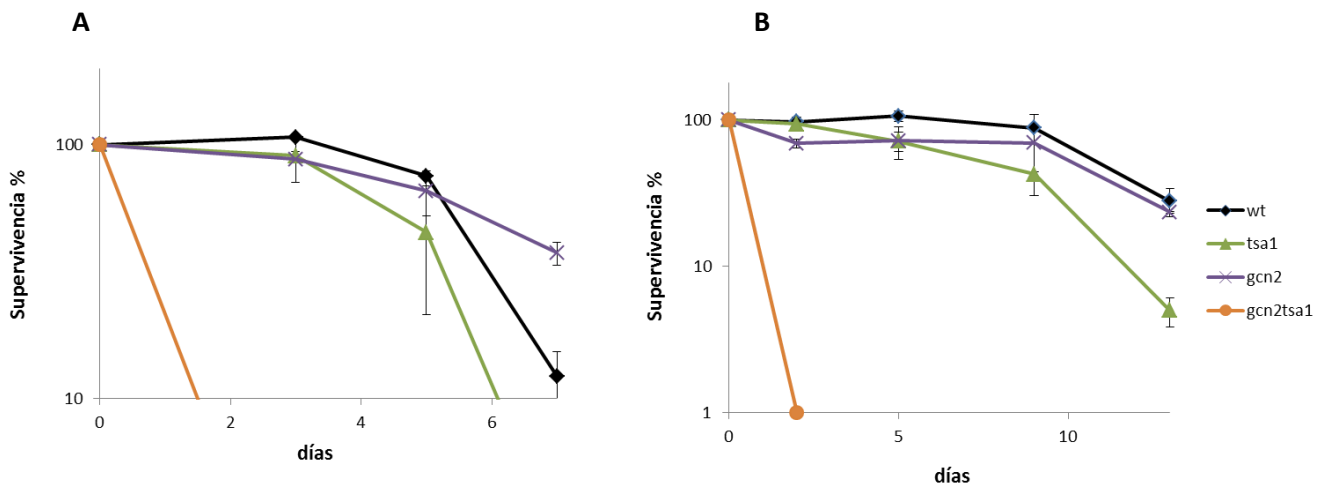


Figura 2.1 Estudio de la interacción genética entre *TSA1* y *GCN2* en experimentos de envejecimiento. Curvas de supervivencia en medio mínimo completo SC de los mutantes de delección *tsa1* Δ , *gcn2* Δ y doble *tsa1* $\Delta*gcn2* Δ . Se utilizó el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad (**A**). Curvas de supervivencia en condiciones de ayuno de nitrógeno en medio SC 1/25N. Se utilizó el día 7 de crecimiento en el medio SC 1/25 N como 100% de viabilidad (**B**). Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).$

A continuación se realizaron microvinificaciones en mosto natural de la variedad de uva tempranillo para estudiar el fenotipo de crecimiento de estos mutantes en este medio mucho más complejo. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 2.2. En el panel A se muestra el crecimiento de los mutantes y de la cepa silvestre, donde se observa que no hay diferencias claras entre sus perfiles de crecimiento. Tomando el día 8 de crecimiento, que delimita el final del periodo de máxima densidad celular, como 100% de viabilidad, se obtienen las curvas de supervivencia que se muestran en la Figura 2.2B. El mutante *gcn2* Δ presenta una ligera extensión en su longevidad cronológica (Figura 2.2B), recordando lo observado en envejecimiento en medio mínimo completo SC (Figura 2.1 A). Sin embargo esto no se observa en el medio SC con nitrógeno limitado (Figura 2.1 B) que en teoría simula mejor el ratio carbono/nitrógeno del mosto. Este comportamiento del mutante *gcn2* Δ sugiere un limitado papel individual de la proteína quinasa del GAAC en LC nuestras condiciones, y sugiere que el impacto de Gcn2p debe ser mayor en condiciones de desequilibrio nutricional, y no solo por limitación del nitrógeno total en un medio que sigue siendo rico en el sentido que contiene los veinte aminoácidos y amonio.

Tanto el mutante *tsa1* Δ como el doble mutante *gcn2* $\Delta*tsa1* Δ tienen una longevidad cronológica similar al silvestre, excepto al final del proceso fermentativo donde la supervivencia del doble mutante y del mutante simple *tsa1* Δ disminuyen, sin mostrar el doble mutante los drásticos efectos aditivos en LC observados en los experimentos de envejecimiento en medio SC. En este caso el fenotipo parece estar totalmente subordinado a$

Resultados y Discusión

la mutación de *TSA1*. Como en otros muchos mutantes analizados en este trabajo, en condiciones que imponen un metabolismo predominantemente fermentativo, el mutante *tsa1Δ* y sobre todo el doble mutante, que presentaban una supervivencia muy inferior a la de la cepa silvestre en condiciones predominantemente respiratorias, no muestran defectos drásticos ni en el crecimiento ni en la viabilidad en mosto natural. Como ya se ha mencionado, el mosto de uva es un medio muy complejo que se caracteriza por la gran cantidad de azúcares presentes (232g/L en este caso), que produce importante estrés osmótico, y por su bajo contenido en nitrógeno, que es una de las primeras causas de las paradas en la fermentación.

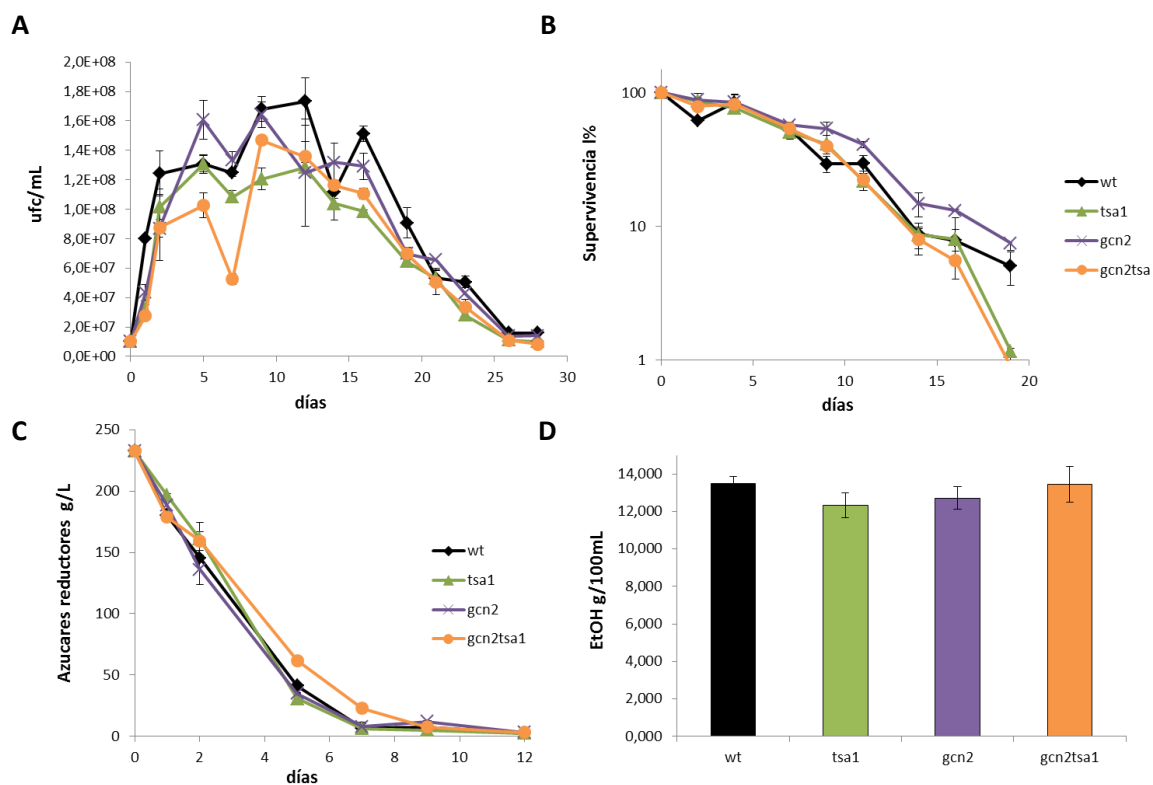


Figura 2.2. Estudio de la interacción genética entre *TSA1* y *GCN2* en condiciones de vinificación. Perfiles de crecimiento en mosto natural, variedad tempranillo, de los mutantes *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y doble mutante *tsa1Δgcn2Δ*, a lo largo del proceso fermentativo (**A**). Viabilidad en mosto natural tomando como 100% de viabilidad el tiempo 8 de crecimiento. Se representa la supervivencia en escala logarítmica y porcentaje con el paso del tiempo (**B**). Consumo de los azúcares reductores en g/L a lo largo del proceso de la fermentación alcohólica (**C**). Producción de alcohol en g/100mL al final del proceso fermentativo (**D**). Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

De estos experimentos, se puede concluir que la función de la peroxirredoxina Tsa1p no juega un papel tan determinante en estas condiciones de metabolismo fermentativo y limitación de nitrógeno respecto a una situación de fase estacionaria estándar como la que se produce en medio SC.

Como en todos los experimentos de vinificación en mosto natural, se midió también el consumo de los azúcares (Figura 2.2C) y la producción de etanol al final de la fermentación (Figura 2.2D) como indicadores de la capacidad fermentativa y del progreso de la vinificación. Se puede observar que la cepa doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* presenta un consumo más lento de los azúcares presentes en el mosto (pese a tener un número similar de células) pero es capaz de completar su consumo, así como producir una concentración final de etanol similar a la cepa silvestre. Los mutantes simples no presentan diferencias destacables en el metabolismo fermentativo.

2.1.2 Estudio de la conexión entre la peroxirredoxina citosólica Ahp1p y Gcn2p

El estudio de las interacciones entre las peroxirredoxinas y el GAAC se continuó con Ahp1p, una peroxirredoxina citoplasmática que protege frente a los hidroperóxidos alquílicos, reduciéndolos. Para ello, se construyeron los correspondientes mutantes, el simple en *AHP1* y doble con *GCN2*, en la cepa C9. La Figura 2.3 muestra los resultados de los experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC y de microvinificación en mosto natural, variedad tempranillo. Como se observa en el Panel A, la delección únicamente del gen *AHP1* no presenta fenotipo, mientras el doble mutante *gcn2Δahp1Δ* presenta una extensión de la longevidad cronológica moderada, que sitúa su supervivencia entre la de la cepa silvestre y el mutante *ahp1Δ* y la más incrementada del mutante *gcn2Δ*. En cualquier caso no se observa el efecto aditivo en la delección de esa peroxidasa. En el panel B, se observa el crecimiento en mosto natural, donde ambos mutantes simples no presentan diferencias significativas de crecimiento respecto de la cepa silvestre y el doble mutante *gcn2Δahp1Δ* presenta un crecimiento ligeramente mayor. Utilizando el día 3 como máximo de densidad celular y, por tanto, como 100% de viabilidad, se obtienen las curvas de supervivencia que se muestran en el Panel C, donde se observa una bajada en LC en el mutante sencillo *AHP1*. Eso refleja su relevancia en fermentación, quizás protegiendo a la célula de los peróxidos alquílicos que se producen a partir de la oxidación de lípidos, y que es algo que se da en la fermentación vínica (Auesukaree, 2017). La delección de *GCN2* no tiene un efecto significativo en LC y se observa la extensión de la longevidad en el doble mutante *gcn2Δahp1Δ*, sugiriendo funciones contrapuestas. Al deleccionar *AHP1*, se podrían estar activando mecanismos de compensación por la presencia de otras peroxirredoxinas citoplasmáticas, entre las que Tsa1p es la más abundante y tiene un papel más importante. Como en todos los experimentos de vinificación en mosto natural, se midió el consumo de azúcares reductores a lo largo del proceso (Figura 2.3D) y el etanol producido al final de la fermentación (Figura 2.3E), no observándose diferencias significativas en el primer caso pero sí un significativo descenso de la concentración final de etanol en la fermentación conducida por el doble mutante *gcn2Δahp1Δ*, hecho que puede justificar su mayor longevidad en las fases finales de la vinificación.

En mosto, como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, se produce un ayuno de nitrógeno que requiere la activación de rutas de respuesta a este ayuno. En el mutante simple *ahp1Δ* hay una compensación de la ausencia de esta peroxirredoxina ya que se encuentran las otras dos peroxirredoxinas citosólicas, Tsa1p y Tsa2p, que, además, son más abundantes. Esta activación compensatoria podría explicar la menor LC del mutante *ahp1Δ* en mosto.

Resultados y Discusión

Podría explicarse por un exceso en la protección. Cuando se combina la delección de *AHP1* con la delección de *GCN2* se produce una extensión de la LC (Figura 2.3C).

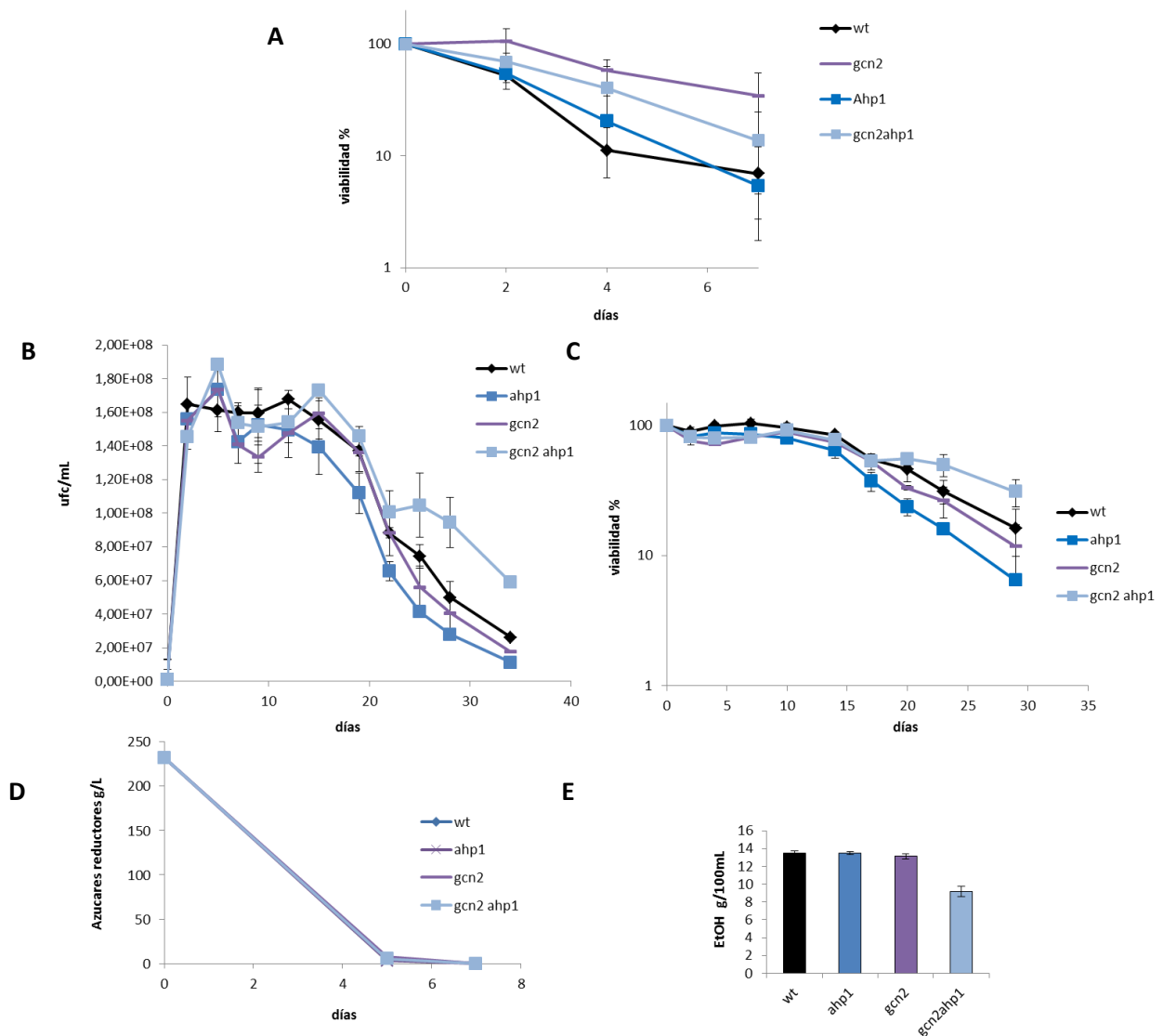


Figura 2.3. Estudio de la interacción entre *AHP1* y *GCN2* en condiciones de envejecimiento en medio SC y en vinificación. Curvas de supervivencia de los mutantes *ahp1* Δ , *gcn2* Δ y el doble *gcn2* Δ *ahp1* Δ en medio mínimo completo SC, tomando el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad (A). Curvas de crecimiento de las mismas cepas en vinificaciones en mosto natural, variedad tempranillo (B). Curvas de supervivencia en las vinificaciones en mosto natural tomando el tiempo 8 del panel B como 100% de viabilidad. Se representa la supervivencia en escala logarítmica y porcentaje con el paso del tiempo (C). Consumo de los azúcares reductores en g/L a lo largo del proceso de la fermentación alcohólica (D). Producción de alcohol en g/100mL al final del proceso fermentativo (E). Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Al eliminar la quinasa *GCN2* se elimina la activación de la respuesta a un ayuno de aminoácidos y por lo tanto la célula activa mecanismos de supervivencia a estas deficiencias, similar a una restricción calórica, que hace, que se adapte y le permita una mayor supervivencia con el paso del tiempo. Los resultados del estudio de la conexión entre *Ahp1p* y *Gcn2p* indican cierta interacción de ambas mutaciones en la determinación de la LC, en

experimentos tanto de envejecimiento en medio completo SC como en vinificación en mosto natural, aunque muy lejos de la fuerte interacción descrita entre *TSA1* y *GCN2*.

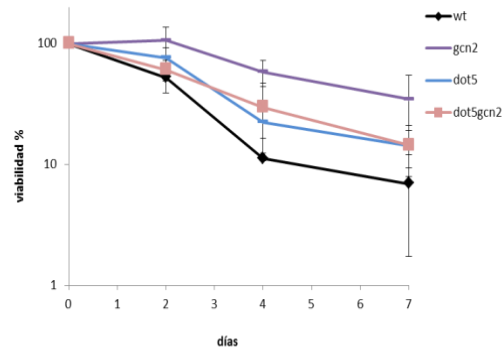
2.1.3 Estudio de la conexión entre la peroxirredoxina nuclear Dot5p y Gcn2p

Dot5p (Disruptor Of Telomeric silencing) es la peroxirredoxina nuclear que funciona como una alquil hidroperóxido reductasa durante la fase postdiaúxica (Cha et al., 2003). Para su estudio, se deletó el gen *DOT5* en la cepa silvestre C9 y en el mutante *gcn2Δ* y se llevaron a cabo experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC y en fermentación en mosto natural, variedad tempranillo, cuyos resultados se muestran en la Figura 2.4. En los experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC, Figura 2.4A, se puede ver que todos los mutantes analizados tienen una longevidad cronológica extendida respecto de la cepa silvestre, y que no hay un efecto sinérgico entre ambas mutaciones, sino que la LC extendida provocada por la mutación *dot5Δ* no se ve adicionalmente extendida por la combinación con la delección de *GCN2*. En el panel B se muestra el crecimiento de las diferentes cepas en mosto natural, donde se observa que el mutante *dot5Δ* presenta un crecimiento un poco menor que el resto de cepas. Si tomamos el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad, obtenemos las curvas de supervivencia, Figura 2.4C, en las el mutante *dot5Δ* muestra una longevidad cronológica ligeramente menor que el resto de cepas, observándose claramente la caída de su supervivencia en la fase final, lo que es consistente con su función en fase de crecimiento post diaúxica y con la previamente descrita disminución de la longevidad de este mutante en fase estacionaria (Cha et al., 2003). Sin embargo, cuando se combina la delección del gen *DOT5* con la de *GCN2*, se observa una supresión del defecto de supervivencia en fase estacionaria, de manera que la interacción genética es similar a la de Ahp1p y de signo opuesto a la que ocurre con Tsa1p, de manera que las alquilperoxidasas tienen una relación similar con la GAAC durante vinificación, que tendría un efecto negativo en la supervivencia cuando las alquilperoxidasas están ausentes, sugiriendo la existencia de algún mecanismo de compensación regulado por GAAC que requeriría experimentos adicionales para dilucidarse.

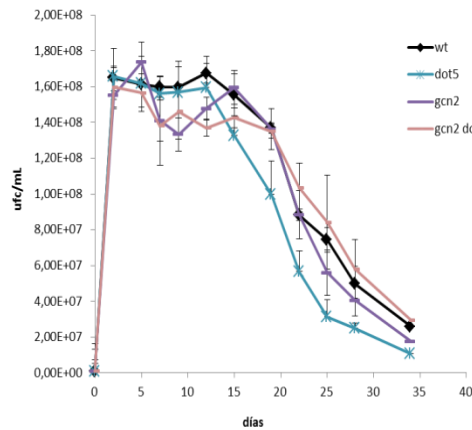
En las Figuras 2.4D y 2.4 E se observa que no hay diferencias significativas en el consumo de los azúcares pero si una menor concentración de etanol en la vinificación conducida por el doble mutante *gcn2Δdot5Δ*. Lo que, como en el caso del doble mutante *gcn2Δahp1Δ*, puede ser la causa de la ligera extensión de su longevidad cronológica.

Resultados y Discusión

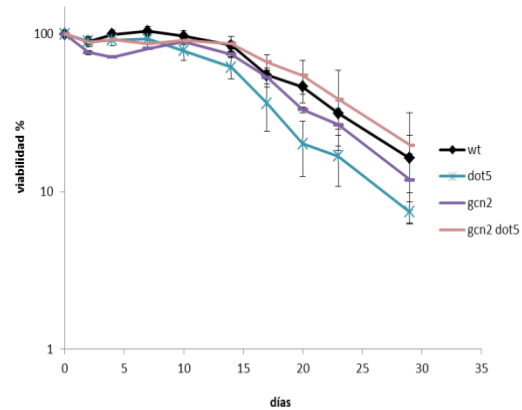
A



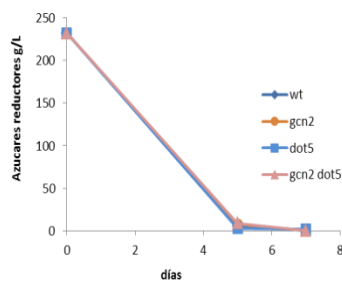
B



C



D



E

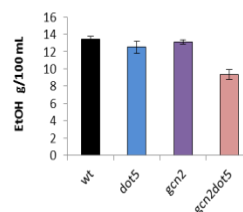


Figura 2.4. Estudio de la interacción entre *DOT5* y *GCN2* en condiciones de envejecimiento en medio SC y de vinificación en mosto natural. Curvas de supervivencia en medio mínimo completo SC tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad (A). Curvas de crecimiento en mosto natural, variedad tempranillo, de los mutantes *dot5* Δ , *gcn2* Δ y el doble mutante *dot5* Δ *gcn2* Δ , a lo largo del proceso fermentativo (B). Curvas de supervivencia en mosto natural tomando el tiempo 8 de crecimiento del Panel A como 100% de viabilidad. Se representa la supervivencia en escala logarítmica y porcentaje con el paso del tiempo (C). Consumo de los azúcares reductores en g/L a lo largo del proceso de la fermentación alcohólica (D). Producción de alcohol en g/100mL al final del proceso fermentativo (E). Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

2.1.4 Estudio de la conexión entre la Sulfiredoxina Srx1p y Gcn2p

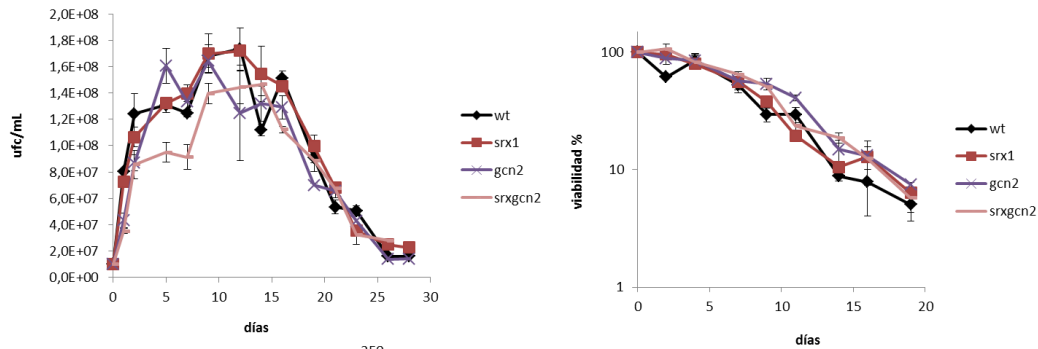
Puesto que Srx1p juega un papel relevante en la regulación redox de la actividad de la peroxidoxina Tsa1p, y dado que la regulación traduccional de su expresión depende de la protein quinasa del GAAC, Gcn2p, se decidió estudiar también la conexión fenotípica entre *GCN2* y *SRX1*. Para ello, se contruyeron los mutantes simple *srx1Δ* y doble *srx1Δgcn2Δ* en la cepa vínica C9 y se llevaron a cabo experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC y con nitrógeno asimilable reducido SC 1/25 y en condiciones de vinificación en mosto natural, cuyos resultados se muestran en la Figura 2.5.

Como se observa en los paneles A, B y C, correspondientes a las condiciones de vinificación en mosto natural, no existen diferencias significativas en el comportamiento de los mutantes simple *srx1Δ* y del doble *srx1Δgcn2Δ* en ninguno de los parámetros analizados. Sin embargo, si que se observan fenotipos de envejecimiento claros para ambos en los experimentos en SC (Panel D) y SC 1/25N (Panel E). El mutante *srx1Δ* presenta una longevidad cronológica extendida en medio mínimo completo SC (Panel D). Este resultado es sorprendentemente contrario a lo observado en la delección de *TSA1*. Esto podría indicar que la función relevante de Tsa1p para la longevidad cronológica es su actividad de carabina molecular y no la de degradación del peróxido de hidrógeno, ya que la delección de *SRX1* desplazaría el equilibrio hacia la formación de los agregados de Tsa1p. Se observa también el comportamiento ya descrito del mutante *gcn2Δ*, que ve extendida su longevidad respecto de la cepa silvestre pero menos que el mutante *srx1Δ*. El doble mutante *srx1Δgcn2Δ* tiene el mismo fenotipo que el simple *gcn2Δ*, sugiriendo que en estas condiciones de envejecimiento cronológico en unas condiciones predominantemente respiratorias, la quinasa Gcn2p promueve algún mecanismo que favorece la extensión de la longevidad mediada por la supuesta agregación de Tsa1p. Sin embargo a día de hoy no se ha encontrado la participación de Gcn2p en la formación de dichos agregados (Trotter et al., 2008).

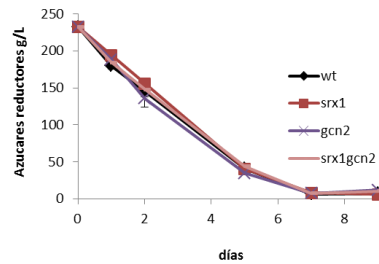
En cuanto a la supervivencia en condiciones también respiratorias pero, además, de restricción en la disponibilidad de nitrógeno (Panel E), Srx1p tiene la misma función. Sin embargo se observa que el doble mutante *gcn2Δsrx1Δ* pasa a comportarse como el mutante simple *srx1Δ*, lo que sugiere que los mecanismos adicionales que podrían controlar la actividad de Tsa1p pueden ser dependientes de la abundancia de nitrógeno, y por tanto quizás controlados por la ruta TORC1.

A Resultados y Discusión

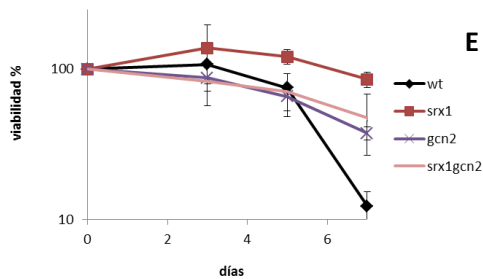
B



C



D



E

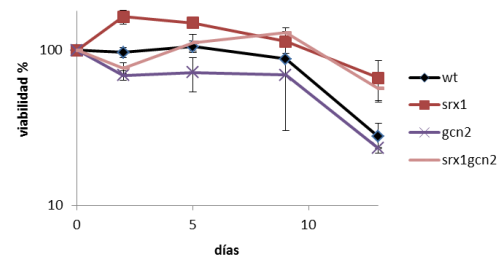


Figura 2.5. Estudio de la interacción entre *SRX1* y *GCN2* en condiciones de envejecimiento en medio mínimo completo SC y en vinificación. Curvas de crecimiento en mosto natural, variedad tempranillo, en los mutantes *srx1* Δ , *gcn2* Δ y doble mutante *srx1* Δ *gcn2* Δ . **(A)**. Curvas de supervivencia en mosto natural tomando el tiempo 8 el Panel A como 100% de viabilidad. Se representa la supervivencia en escala logarítmica y porcentaje con el paso del tiempo **(B)**. Consumo de los azúcares reductores en g/L a lo largo del proceso de la fermentación alcohólica **(C)**. Curvas de supervivencia en medio mínimo completo SCn tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad **(D)**. Curvas de supervivencia en medio mínimo completo con 1/25 de nitrógeno asimilable tomando el día 7 de crecimiento como 100% de viabilidad. **(E)**. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

2.1.5 Estudio del papel del factor transcripcional Gcn4p en la longevidad cronológica durante la fermentación

Dado que además del control global de la traducción, Gcn2p está implicado en la activación transcripcional de genes de biosíntesis de aminoácidos en condiciones de limitación de nitrógeno a través del factor de transcripción Gcn4p, se procedió a estudiar por separado ambos procesos. Para ello se recurrió a la técnica de reemplazamiento de promotores desarrollada en nuestro laboratorio (Cardona et al., 2007).

Ya que el 5'-UTR de *GCN4* contiene unas uORF que son sensibles a la acción de Gcn2p, el uso de un promotor heterólogo eliminará esa función. Para ello se construyeron dos cepas sobreexpresantes de *GCN4*, una con el promotor del gen *SPI1*, que se induce en fase estacionaria (Cardona et al., 2007), y el promotor del gen *MET17*, regulable por metionina y que ha demostrado su inducción en condiciones de vinificación desde el inicio de la misma (Orozco et al., 2013). Se realizaron ensayos de envejecimiento cronológico de estas cepas sobreexpresantes de Gcn4p y del mutante *gcn2Δ* y se obtuvieron las curvas de supervivencia que se muestran en la Figura 2.6. Se observa que ambas cepas sobreexpresantes de *GCN4* presentan una extensión de la longevidad cronológica, indicando que la activación de las rutas de biosíntesis de aminoácidos favorece la extensión de la LC en estas condiciones. Sin embargo, el mutante *gcn2Δ* presenta una extensión similar de LC, resultado consistente con los observados para este mutante en los experimentos anteriores pero aparentemente contradictorio con lo obtenido para las cepas que sobreexpresan *GCN4*, ya que la delección de *GCN2* bloquea la inducción de *GCN4*. Así pues los efectos observados en la delección de *GCN2* posiblemente estén asociados a su control de la traducción.

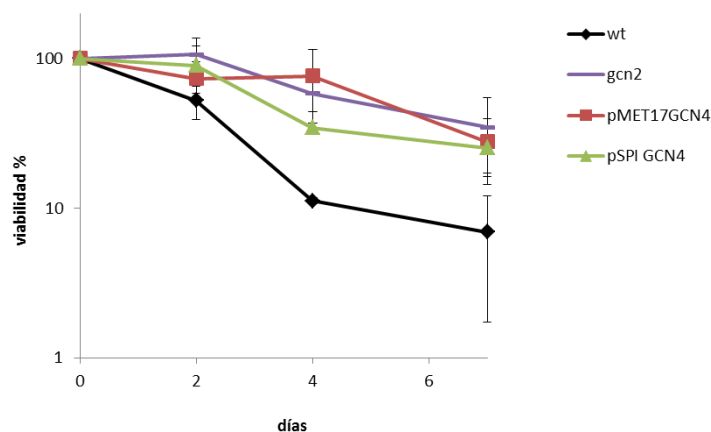


Figura 2.6. Estudio de la interacción genética entre la sobreexpresión de *GCN4* y la delección de *GCN2*. Curvas de supervivencia en experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC de la cepa mutante *gcn2Δ* y de cepas que sobreexpresan *GCN4* en medio mínimo completo SC. Se tomó el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

2.1.6 Estudio de la conexión entre Gcn1p, activador de Gcn2p, y Gcn2p en longevidad cronológica

El complejo Gcn1p-Gcn20p ha sido descrito como regulador positivo de la actividad de la proteína quinasa Gcn2p, a través de una interacción física con su extremo N-terminal (García-barrio et al., 2000; Skvirsky et al., 1986). Por ello, se construyeron los mutantes simples *gcn1Δ* y doble *gcn1Δgcn2Δ* y se llevaron a cabo experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC y con limitación de nitrógeno SC 1/25 y en vinificación en mosto natural. La Figura 2.7 muestra los resultados de estos experimentos.

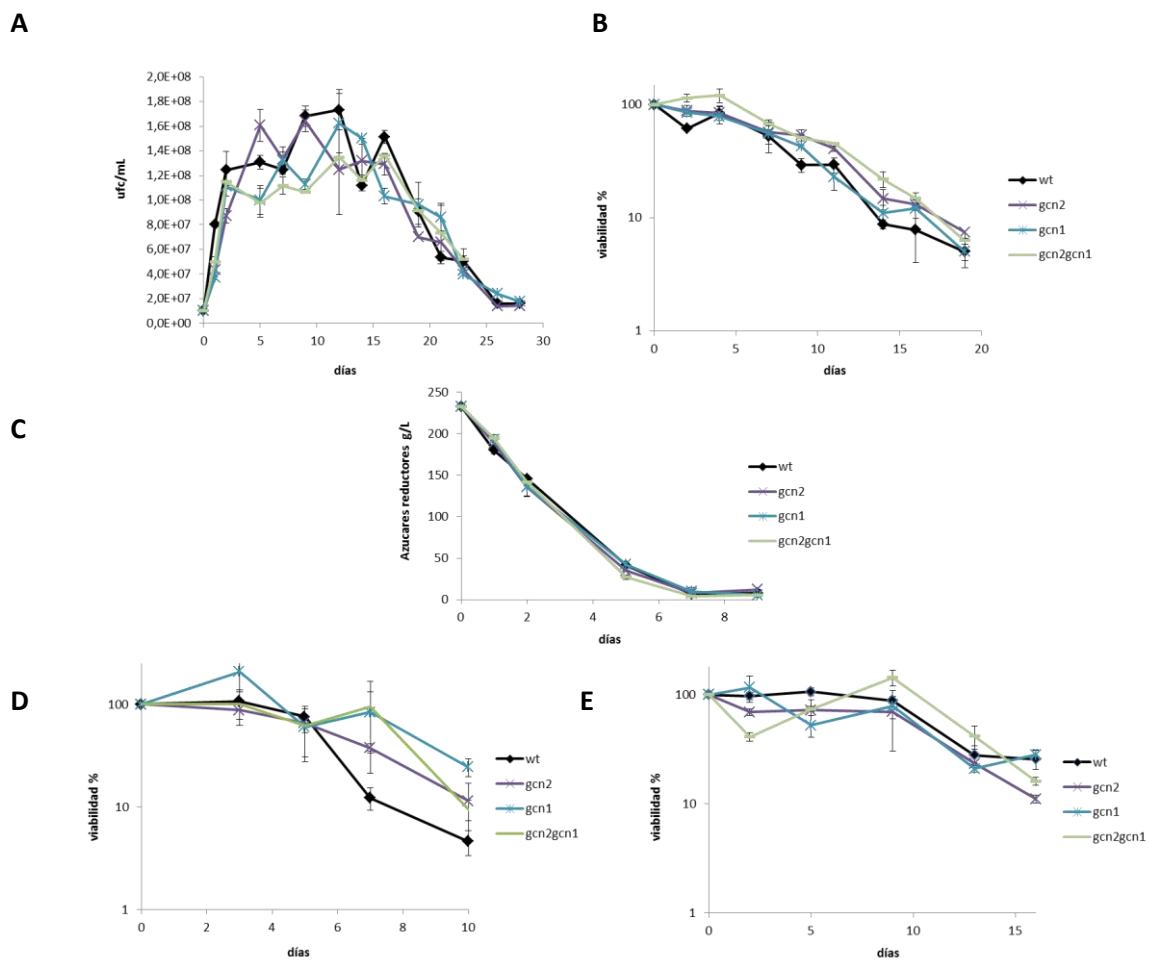


Figura 2.7. Estudio de la interacción genética entre los genes *GCN1* y *GCN2* en experimentos de envejecimiento en medio SC y en vinificación. Curvas de crecimiento de los mutantes *gcn1* Δ , *gcn2* Δ y doble *gcn1* Δ *gcn2* Δ en mosto natural variedad tempranillo (A). Curvas de supervivencia en mosto natural tomando el tiempo 8 del Panel A como 100% de viabilidad. Se representa la supervivencia en escala logarítmica y porcentaje con el paso del tiempo (B). Consumo de los azúcares reductores en g/L a lo largo del proceso de la fermentación alcohólica (C). Curvas de supervivencia en experimentos en medio mínimo completo SC tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad (D). Curvas de supervivencia en experimentos en medio mínimo completo con 1/25 de nitrógeno asimilable tomando el día 7 de crecimiento como 100% de viabilidad. (E). Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

No se observa efecto aditivo de la delección de *GCN1* en ningún aspecto de la vinificación, reforzando la idea de que ambas proteínas trabajan en la misma ruta. Como se puede observar, no hay diferencias significativas en durante el envejecimiento en medio SC (Panel D) ni en medio limitante en nitrógeno (Panel E) entre los mutantes simples y el doble *gcn1* Δ *gcn2* Δ , de manera que podríamos llegar a la misma conclusión.

2.2 Sensibilidad a estrés del doble mutante *gcn2Δtsa1Δ*

2.2.1 Sensibilidad a estrés oxidativo

Con el fin de profundizar en la interacción genética entre *GCN2* y *TSA1* se estudiaron diversos fenotipos, empezando con la respuesta a estrés oxidativo. Se utilizaron tres oxidantes diferentes en ensayos de inhibición de crecimiento en placas de YPD y se midieron halos de inhibición para la cepa silvestre, los mutantes simples, *gcn2Δ* y *tsa1Δ* y en el doble mutante, *gcn2Δtsa1Δ*. Los resultados se muestran en la Figura 2.8A. La menadiona es una quinona, oxidante que genera ROS, principalmente el anión superóxido, afectando a la viabilidad celular y a la morfología celular. Como se observa en la Figura 2.9A en presencia de menadiona 0,5 M el mutante *gcn2Δ* presenta un diámetro de inhibición similar a la cepa silvestre, indicando que no posee *per se* un papel en el control del equilibrio redox, y el mutante *tsa1Δ* presenta un mayor diámetro de inhibición, lo cual significa que es más sensible a la menadiona, como corresponde a un gen implicado en la tolerancia a estrés oxidativo. En cuanto al *gcn2Δtsa1Δ* se observa aún mayor sensibilidad que el resto de cepas. La diamida, oxida fundamentalmente grupos tiol y de nuevo provoca el mayor halo de inhibición sobre la cepa mutante *tsa1Δ* y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ*, no teniendo fenotipo el mutante *gcn2Δ*. Por lo que frente a este oxidante solo es relevante la acción de Tsa1p. Se utilizó concentraciones del 33% de H₂O₂ en las cuales el mutante *gcn2Δ* no está afectado, *tsa1Δ* presenta una mayor sensibilidad a este compuesto que *gcn2Δ* y que la cepa silvestre, y la sensibilidad del doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* es aún mayor. Estos experimentos de resistencia a estrés por ROS reproducen las interacciones genéticas que han sido previamente descritas respecto del fenotipo de longevidad cronológica de los mutantes simples y doble y permiten sugerir que la falta de resistencia a estrés oxidativo del doble mutante puede contribuir a su reducida longevidad cronológica.

Se confirmó esta sensibilidad en otro tipo de ensayo, que analiza el crecimiento en presencia de estrés y no tanto su supervivencia a un nivel letal de estrés. Para ello se realizaron goteos en placa de YPD en presencia del oxidante H₂O₂ a una concentración de 3mM (Figura 2.8 B). Se observa un fenotipo similar al que se obtiene con el ensayo de los halos de inhibición con peróxido de hidrógeno (Figura 2.8A), el mutante *gcn2Δ* no presenta defecto en el crecimiento en presencia del oxidante, *tsa1Δ* tiene un defecto importante en su crecimiento y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* es incapaz de crecer en presencia de H₂O₂ 3mM. Al deletar *TSA1* las células tienen un defecto de crecimiento en presencia de oxidantes, ya que esta cepa mutante tiene mermada la capacidad de eliminar los ROS producidos por estos compuestos. A pesar de que existen otras peroxirredoxinas, la detoxificación y señalización del H₂O₂ es principalmente a través de Tsa1p. De esta forma, cuando se deleta este gen, no hay un mecanismo compensatorio por parte de las otras peroxirredoxinas y por ello el mutante *tsa1Δ* tiene una sensibilidad aumentada.

Resultados y Discusión

De manera similar ocurre en el doble mutante, *gcn2Δtsa1Δ*, que tanto en el ensayo de halos de inhibición (A) como en el de goteos en placa (B) el defecto de crecimiento es mayor que en el mutante simple *tsa1Δ*, observando una conexión entre Gcn2p y Tsa1p en la respuesta a estrés oxidativo.

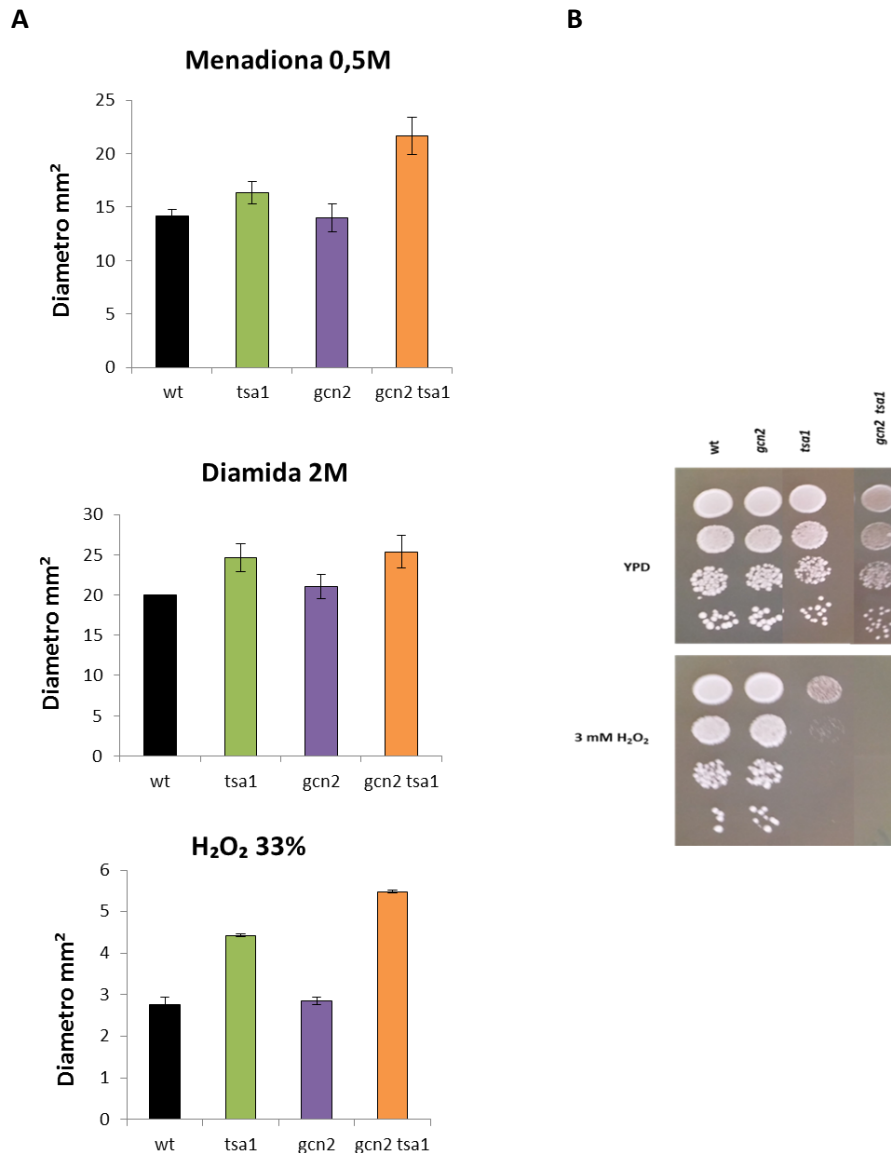


Figura 2.8. Respuesta a estrés oxidativo. Halo de inhibición de crecimiento de las cepas mutantes *gcn2Δ*, *tsa1Δ* y *gcn2Δtsa1Δ* en placas de YPD bajo condiciones de estrés oxidativo por la presencia de menadiona 0.5M, diamida 2M y H₂O₂ 33% (A). Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT). Crecimiento en goteo en placas de medio rico YPD con H₂O₂ 3 mM (B).

Como ya se ha comentado, Gcn2p es una protein quinasa de respuesta a la disponibilidad de aminoácidos en el medio, que está conecta con la ruta TOR, que regula la autofagia y la respuesta a estrés. Tsa1p además se asocia con el ribosoma, tiene un papel en la protección de la oxidación de proteínas ribosomales.

Debido a la implicación de Gcn2p en traducción, potencialmente podría actuar en ciertos mecanismos que controlen la traducción en presencia de un estrés oxidante, de manera general o de proteínas protectoras específicas. Debido a esto, una mayor sensibilidad en el doble mutante al estrés oxidativo por H₂O₂ podría explicarse por una convergencia de procesos de protección en los que están ambas proteínas implicadas. Para discernir el mecanismo que da lugar a dicho fenotipo se han realizado varias aproximaciones que se detallarán a lo largo del capítulo.

2.2.2 Respuesta a la disponibilidad de nitrógeno

2.2.2.1 Goteos en placa con diferentes suplementos de aminoácidos

Como se menciona en la Introducción, el doble mutante de las tiorredoxinas citoplasmáticas *trx1Δtrx2Δ* es auxótrofo para la metionina debido al requerimiento de dichas proteínas en la asimilación de sulfato. Se observó que el mutante *tsa1Δgcn2Δ* presentaba un menor crecimiento en medio mínimo SD (Figura 2.9) y se procedió a estudiar este fenotipo. Se incluyeron los mutantes en *GCN4*, *gcn4Δ* y *tsa1Δgcn4Δ*, en medio mínimo completo SC con los veinte aminoácidos y en placas con medio mínimo SD sin aminoácidos o con adición de un aminoácido concreto. En las placas SD se observó el defecto de crecimiento del mutante *tsa1Δgcn2Δ* mencionado, mientras que en el doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* el efecto existía, pero era menor. Como se observa en la Figura 2.9 todas las cepas crecen bien en el medio SC, excepto el doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* que tiene un pequeño defecto de crecimiento. Para determinar si el doble mutante presenta alguna auxotrofia para algún aminoácido concreto, se añadieron por separados los aminoácidos. Dicho defecto no es debido a ninguna auxotrofia puntual, ya que la adición aislada de los veinte aminoácidos no causa la recuperación del crecimiento (datos no mostrados). De los veinte aminoácidos ensayados, se muestran únicamente los que han producido diferencias significativas de crecimiento. La adición de cuatro de ellos (los mostrados Leu, Ile, Met, Trp) causa incluso un mayor defecto en el crecimiento el doble mutante, que podría explicarse por un *feedback* negativo del aminoácido añadido sobre su ruta de biosíntesis, que alterase de manera indirecta los procesos en los que puede estar implicados Gcn2p y Tsa1p. Dicho efecto no se observa en el mutante doble *tsa1Δgcn4Δ* para Leu, Ile y Met, indicando que es un efecto específico de la función de Gcn2p independiente del control de *GCN4*, probablemente a nivel de traducción. Solo es común el efecto del triptófano, que debe actuar por un mecanismo diferente. En conclusión, el mutante *tsa1Δgcn2Δ* no provoca una respuesta específica, pero limita el crecimiento en medios pobres en aminoácidos por medios no siempre dependientes de la activación de Gcn4p.

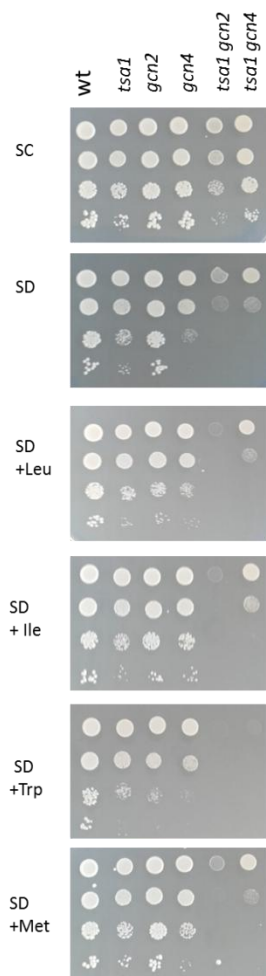


Figura 2.9. Efecto de la adición de aminoácidos específicos sobre el crecimiento de los mutantes. Goteos de las cepas *tsa1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn4Δ*, *tsa1Δgcn2Δ* y *tsa1Δgcn4Δ* en medio mínimo completo SC, y medio mínimo SD (SC sin drop out) con un aminoácido específico añadido.

2.2.2.2 Goteos en placa con diferentes compuestos inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos

Para continuar con el estudio de la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno de los mutantes simples *gcn2Δ*, *tsa1Δ* y doble *gcn2Δtsa1Δ*, se realizaron experimentos de goteos en placa con compuestos que inducen el ayuno intracelular de nitrógeno por inhibición de una ruta de biosíntesis de aminoácidos, desencadenando la ruta GAAC. Se utilizó 3-amino-1, 2,4-triazol (3-AT, 10 y 20 mM) que inhibe la biosíntesis de la histidina y sulfometurón metil (SM) que inhibe la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 2.10, donde se observa que, tanto a 10mM como a 20mM de 3-AT, la cepa silvestre y la cepa mutante *tsa1Δ* crecen normalmente en las condiciones de ayuno de histidina provocadas por el compuesto. El mutante *gcn2Δ*, sin embargo muestra un defecto importante de crecimiento a la concentración más baja, que se incrementa cuando se duplica la dosis de 3AT.

En cuanto al doble mutante *gcn2Δtsa1Δ*, a concentración 10 mM presenta un fenotipo de crecimiento intermedio entre los mutantes simples que no empeora al aumentar al doble la concentración de 3AT. Estos resultados significan que la mutación *tsa1Δ* revierte, al menos en parte, el efecto del 3AT en el mutante *gcn2Δ*, lo cual demuestra, una vez más, una interacción entre la quinasa Gcn2p y la peroxirredoxina Tsa1p en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. La delección de *TSA1* alivia en parte la inhibición causada por el 3AT, sugiriendo su implicación en la regulación de otras rutas que puedan influir en la expresión o actividad de His3p, la enzima diana del 3-AT.

La adición de 1mg/L de SM produce una inhibición de la acetolactato sintasa y un ayuno de los tres aminoácidos de la familia de la leucina. En estas condiciones, los mutantes *gcn2Δ* y *gcn2Δtsa1Δ* son incapaces de crecer. *TSA1* no tiene papel en la regulación de ALS ya que al añadir un inhibidor de esta enzima, el sulfometurón metil (SM), el mutante *tsa1Δ* no presenta un defecto en el crecimiento.

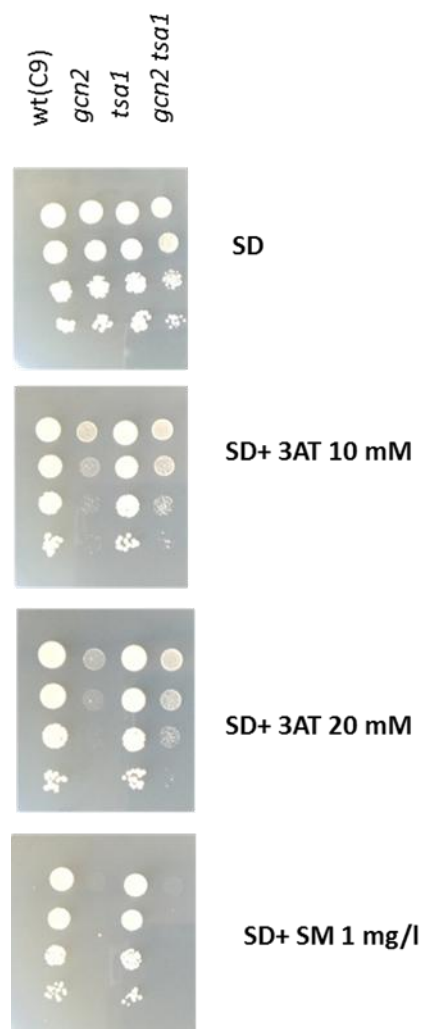


Figura 2.10. Efecto de la adición de inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos específicos sobre el crecimiento de los mutantes. Goteos de las cepas *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y *tsa1Δgcn2Δ* en medio mínimo SD (SC sin drop out) bajo ayuno de nitrógeno por histidina en el caso de la adición del 3AT (10 y 20 mM) o leucina, isoleucina y valina en el caso del SM 1mg/L.

Resultados y Discusión

La sensibilidad de la delección de *GCN2* a estos niveles de SM es tan elevada que no podemos vislumbrar ninguna diferencia en el doble mutante que permita explicar el efecto negativo de la adición de leucina e isoleucina en el medio observada en la Figura 2.9. La delección de *GCN4* causa una inhibición total del crecimiento con estos inhibidores (datos no mostrados).

2.2.2.3 Goteos en placa con rapamicina para la inhibición de *TORC1*

Los datos previos sugieren que Tsa1p podría estar regulando procesos relacionados con la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. Además de la ruta GAAC la principal vía de señalización por aminoácidos es la ruta TORC1. Se usó el inhibidor del complejo TORC1, rapamicina, para estudiar su efecto en estas cepas. Se utilizaron placas de medio rico YPD con rapamicina 100nM (Figura 2.11). Se estudió el papel de los mutantes *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y el doble entre estos dos y también se estudió otras proteínas de la ruta GAAC como *gcn4Δ* y su doble con *tsa1Δ*, *tor1Δ* como control positivo del defecto de autofagia y *sch9Δ* que es la proteína quinasa de la ruta de señalización de respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. En la Figura 2.11 se muestra el crecimiento en goteos de estas cepas en medio YPD con rapamicina.

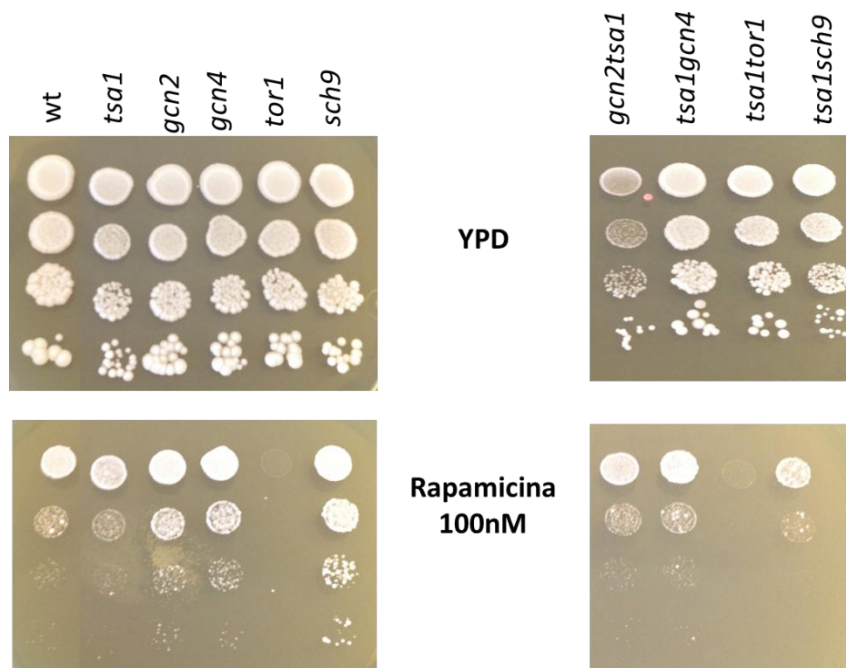


Figura 2.11. Respuesta a inhibición de *TOR1* en medio rico YPD. Crecimiento en goteo en placas de medio rico YPD de las cepas mutantes *gcn4Δ*, *tsa1Δ*, *gcn2Δ*, *sch9Δ* y *tor1Δ* así como los dobles mutantes *tsa1Δgcn4Δ*, *gcn2Δtsa1Δ*, *tsa1Δsch9Δ* y *tsa1Δtor1Δ* en presencia de rapamicina 100nM.

Como se puede observar, los mutantes *gcn2Δ* y *gcn4Δ* presentan un crecimiento mayor en presencia de rapamicina, lo cual sugiere que GAAC puede inhibir parcialmente TORC1. El crecimiento en presencia de rapamicina de la cepa silvestre es similar al del mutante *tsa1Δgcn2Δ* por lo que se puede concluir que no hay una interacción entre *TSA1* y la ruta TORC1 mediante el estudio con rapamicina. Los dobles mutantes no aportan información adicional al respecto.

2.2.2.4 Efecto de las deleciones de *TSA1* y *GCN2* en autofagia

Una forma de abordar la conexión entre Tsa1p y Gcn2p es a través de la autofagia. Se ha descrito recientemente una nueva modalidad de autofagia, autofagia mediada por chaperonas o CMA (Chaperone Mediated Autophagy) que, hasta la fecha, sólo ha sido descrita en eucariotas superiores (Noda and Inagaki, 2015). Además, se ha demostrado el papel de *TOR1* en la activación de *GCN2* y que ésta tiene una implicación en la autofagia (Yuan et al., 2017a). El estudio de la autofagia de los mutantes simples *tsa1Δ* y *gcn2Δ* así como del doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* podría vislumbrar la conexión existente entre estas dos proteínas.

Para estudiar de una manera precisa y cuantitativa el defecto de autofagia en los mutantes simples *tsa1Δ* y *gcn2Δ* y en el doble *tsa1Δgcn2Δ* se utilizó la proteína de fusión Pgc1p-GFP, sustrato de la autofagia. Los resultados se muestran en la Figura 2.12 para las cepas *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* en crecimiento exponencial en medio SD tomando como tiempo 0 el cultivo exponencial antes de cambiarlo a un medio sin nitrógeno y a tiempo 4, que son cuatro horas de crecimiento en SD sin nitrógeno. Como se observa en la Figura 2.14, todas las cepas a tiempo 4 horas de crecimiento en un medio sin nitrógeno presentan autofagia, mostrando por un lado, una banda de mayor masa molecular correspondiente a Pgc1p-GFP y otra, de menor peso molecular, correspondiente al GFP.

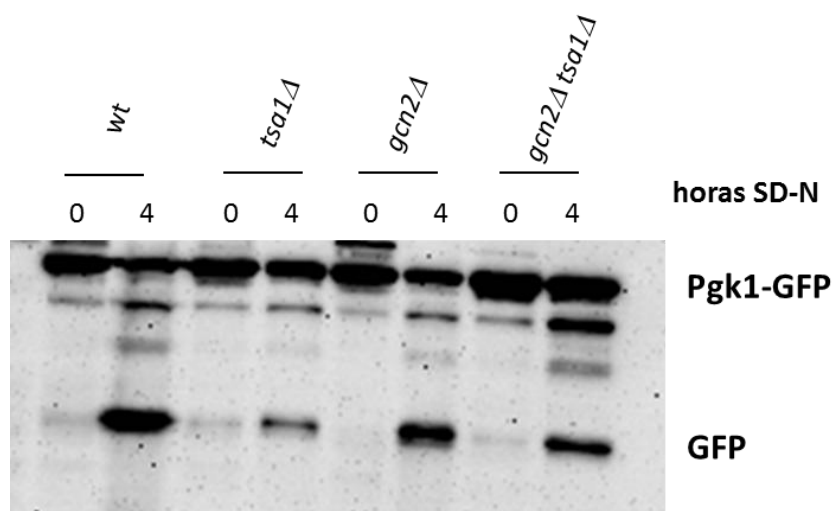


Figura 2.12. Estudio de la autofagia en las cepas mutantes *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y *gcn2Δtsa1Δ* en condiciones de ayuno de nitrógeno. La autofagia se determinó tras 4h en medio sin nitrógeno mediante detección western blot de la proteína de fusión Pgc1p-GFP con el anticuerpo anti-GFP.

Se cuantificó la intensidad de las bandas de Pgc1p-GFP y de GFP para determinar el porcentaje de autofagia en cada cepa. En la cepa silvestre, el porcentaje de autofagia es del 58.5%, esto quiere decir que más de la mitad de Pgc1p-GFP se autofagocita en 4h en condiciones de ayuno de nitrógeno. El mutante *gcn2Δ* presenta un 53.2% de autofagia con niveles similares respecto de la cepa silvestre. Por otro lado, tanto el mutante simple *tsa1Δ*, con un valor del 42.3% de autofagia, como el doble *gcn2Δtsa1Δ*, con solo un 39%, muestran valores significativamente menores que los de la cepa silvestre indicando que ambos tienen un defecto en la autofagia en condiciones de ayuno de nitrógeno, a pesar de no observarse diferencias en crecimiento en placa (Figura 2.11). Los resultados de autofagia disminuida en los mutantes simple *tsa1Δ* y doble *tsa1Δgcn2Δ* de nuevo sugieren una conexión entre *TSA1* y *GCN2* en la respuesta autofágica al ayuno de nitrógeno y podría explicar la baja viabilidad del doble mutante en medio mínimo. Este papel no estaría controlado por TORC1 por la falta de sensibilidad a rapamicina del mutante. Se observó que el estrés oxidativo *per se* no desencadena una respuesta autofágica (ver mas adelante).

2.2.2.5 Estudio de la expresión de genes de respuesta a la disponibilidad de nitrógeno

Como aproximación complementaria en la caracterización de la interacción entre *TSA1* y *GCN2* se abordó el análisis de la expresión de tres genes regulados por nitrógeno como indicadores del metabolismo nitrogenado.

Los genes escogidos fueron *GDH2*, *MEP2* y *DAL5* (Conrad et al., 2014). *GDH2*, es una glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , degrada glutamato a amonio y α -ketoglutarato, su expresión es sensible a represión por nitrógeno y por niveles de amonio intracelular. *MEP2* es una permeasa de amonio implicada en la regulación del crecimiento pseudohifal. Pertenece a la familia de proteínas de membrana citoplasmática que transporta sólo amonio (NH_4^+). Su expresión está sometida a represión por catabolito. *DAL5* es una permeasa de alantoato y ureidosucinato que también transporta dipéptidos. Se ha demostrado que en presencia de 3AT se produce una respuesta conjunta a Gcn4p y Gln3p que es independiente de la respuesta a estos factores de transcripción por separado y que afecta, entre otros, a los genes *DAL5* y *GDH2* (Hernández et al., 2011). Los análisis se realizaron en las cepas silvestre C9, *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y *gcn2Δtsa1Δ* mediante RT-qPCR (apartado 3.4 de Materiales y Métodos) y en condiciones de envejecimiento cronológico, (Figura 2.13) y de fermentación en mosto sintético, en ambos casos con alta y baja concentración de nitrógeno (Figura 2.14).

En la Figura 2.13 se muestran los resultados de los experimentos de envejecimiento, que se diseñaron como se describe a continuación. Las células se cultivaron en medio SC en el que se tomaron muestras a tiempo 0 de envejecimiento, que correspondería a día 3 de crecimiento y a tiempo 3 de envejecimiento, que correspondería a día 6 de crecimiento. Se realizó también un envejecimiento en medio SC pero con sólo 1/25 de nitrógeno asimilable (representado en la figura como -N) para estudiar las diferencias en la respuesta a la baja disponibilidad de nitrógeno. Se midió el tiempo 0 de envejecimiento (día 7 de crecimiento) y el día 5 que correspondería a día 12 de crecimiento.

En el caso del gen *GDH2* (verde) se observa que en la cepa silvestre, a tiempo 0 de envejecimiento (3 días de crecimiento en el medio) hay expresión de *GDH2* que desaparece a tiempo 3 de envejecimiento (día 6 de crecimiento). A tiempo 0 de envejecimiento, la expresión de *GDH2* en la cepa silvestre responde a la necesidad de captar nutrientes del medio en las condiciones de ya baja disponibilidad, tras 3 días de crecimiento. A tiempo 3 de envejecimiento que corresponde a 6 de crecimiento, ya no se observa expresión de *GDH2* en la cepa silvestre que se encuentra en condiciones de supervivencia en las que no se invierte en la expresión de genes para obtener energía, solo en sobrevivir. En cuanto a la expresión de *GDH2* en envejecimiento con 1/25 N en el medio, no se observa diferencias significativas entre el t0 de envejecimiento (día 7 de crecimiento) y el t5 (día 12 de crecimiento), lo que probablemente significa, que en un medio con menos cantidad de nitrógeno, se activa la expresión de *GDH2*, para conseguir nitrógeno a través de la degradación de glutamato a amonio. En un medio limitante en nitrógeno no hay diferencias entre el tiempo inicial de envejecimiento y el tiempo 5 de envejecimiento (diferencia con respecto al medio SC). Una posible explicación es que aunque las células estén en una fase de supervivencia, al estar en un medio con limitación de nitrógeno, hay una expresión constante del gen *GDH2* por la constante necesidad de amonio.

Si nos fijamos en la cepa mutante *tsa1Δ*, a t0 presenta niveles de mRNA de *GDH2* similares a la de la cepa silvestre y en la reducción que observamos a t3 de envejecimiento se observan diferencias pero son cuantitativamente menores que las observadas en la cepa silvestre. En *tsa1Δ* se observa una caída en la expresión de *GDH2* a t3 mientras que en el silvestre no se observaba expresión. Si observamos los niveles de expresión en envejecimiento con 1/25 de N en el mutante *tsa1Δ*, entre t0 y t5 se observa una reducción de los niveles de mRNA que no se observa en la cepa silvestre.

En cuanto al mutante *gcn2Δ*, presenta una expresión de *GDH2* similar al silvestre, disminuyendo los niveles de mRNA del t0 al t3 en condiciones de envejecimiento en SC. A t3, no hay una disminución tan acusada, siendo similar a lo que ocurre en el mutante *tsa1Δ*. En cambio, los niveles de expresión de *GDH2* en el mutante *gcn2Δ* a t0 y t5 de envejecimiento en medio SC con 1/25 N no varían, a diferencia del mutante *tsa1Δ* y de manera similar a la cepa silvestre. En el doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* se observa la expresión de *GDH2*, tanto en envejecimiento en SC normal (t0 y t3) como en envejecimiento en SC con 1/25 de nitrógeno (t0 y t5), sin diferencias significativas en las condiciones ensayadas, que sugieren una necesidad permanente de aumentar los niveles de amonio.

En el caso de la expresión de *MEP2* (permeasa de amonio), en color rojo, se observa que los niveles de mRNA de esta permeasa en la cepa silvestre son altos en el t0 de envejecimiento en medio con bajo contenido en nitrógeno, mientras que no se observa expresión a t0 y t3 de envejecimiento en medio SC, sugiriendo que la cepa silvestre activa la expresión de la permeasa de amonio a t0 de envejecimiento sin nitrógeno como necesidad de captación de fuentes de nitrógeno asimilables.

Resultados y Discusión

Una posible explicación a esta diferencia en la expresión de *MEP2* en la cepa silvestre en envejecimiento SC con respecto a la expresión de *GDH2* en la cepa silvestre en medio SC es que, a día tres de envejecimiento en medio SC la necesidad de amonio se suple con los nutrientes de reserva o con la autofagia de proteínas que permitirían obtener amonio a través de la acción de la *GDH2*, a t3 de envejecimiento en SC no se activan las permeasas de amonio (*MEP2*), no se necesita la captación de amonio ya que en el medio no habría muchos nutrientes. En el caso del mutante *tsa1Δ* hay un defecto en la expresión de esta permeasa ya que a t0 de envejecimiento en medio SC con 1/25 de N apenas hay expresión de *MEP2*. En cambio, los niveles de mRNA de *MEP2* en el mutante *gcn2Δ* a t0 y t3 de envejecimiento en SC son similares a los de la cepa silvestre, y también lo son a t0 de SC 1/25N, mientras que a t5 de envejecimiento en SC1/25N los niveles de expresión de *MEP2* son más del doble que a t0 en este mismo medio. En cuanto a la expresión del *MEP2* en el doble mutante es una expresión mucho más similar a la de *gcn2Δ* pero sin la fuerte inducción a t5 sin nitrógeno.

En envejecimiento en SC tanto a t0 como a t3 no hay inducción de la expresión de *MEP2* en el doble mutante. Sin embargo, en envejecimiento con menos nitrógeno, hay inducción de la expresión de *MEP2* a t0 que es una inducción similar a la de *gcn2Δ* y a t5, la expresión en el doble mutante se mantiene constante, no varía (al igual que ocurre en la expresión del gen *GDH2*). Por último, para la expresión de *DAL5*, en color azul, se observa un perfil de expresión muy similar a la expresión de *MEP2*, salvo por la clara inducción de la acumulación de mRNA a t5 en medio SC 1/25 en el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ*. En el caso del doble mutante, se requiere a día 5 de envejecimiento en un medio sin nitrógeno, un aumento en los niveles de la permeasa *DAL5*.

Estos resultados sugieren que por un lado tanto la expresión de *DAL5* como la expresión de *MEP2* no son necesarias para el envejecimiento en medio SC pero, si las levaduras se encuentran en un medio con menos nitrógeno (1/25) activan las permeasas para poder captar fuentes de nitrógeno asimilables por la levadura. Hay una mayor expresión de las permeasas en el mutante *gcn2Δ* y en el doble mutante. Es decir, en cuanto al silvestre en envejecimiento en SC no es necesaria la captación de nitrógeno a través de las permeasas. Debido a ello, se observa en SC en el silvestre a tiempo 0 una inducción de la glutamato deshidrogenasa, *GDH2*, para poder obtener esta fuente de nitrógeno que se necesita a partir del glutamato almacenado. La inducción de *GDH2* es mayor en medio donde sólo hay 1/25 N.

Sin embargo, *MEP2* y *DAL5*, al ser permeasas no son necesarias en SC pero sí que lo son cuando el medio tiene menos nitrógeno. En el caso de los mutantes, destacar a *gcn2Δ* cuyos niveles de *MEP2* y *DAL5* incrementan muchísimo en condiciones de deficiencia de nitrógeno. En cuanto al doble mutante, tiene una expresión similar a *gcn2Δ* en el caso de *DAL5* y una expresión intermedia entre la expresión de *tsa1Δ* y *gcn2Δ* en el caso de *MEP2*.

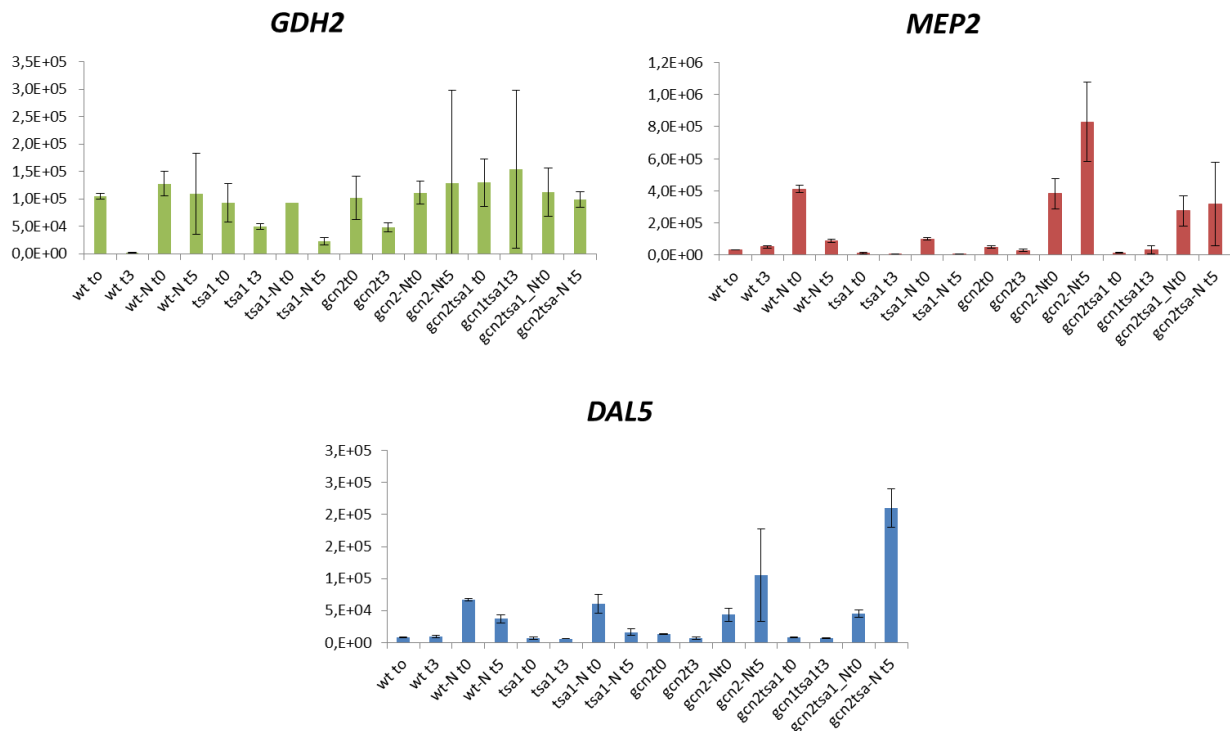


Figura 2.13. Expresión de genes del metabolismo del nitrógeno en envejecimiento cronológico. Estudio de la expresión de tres genes de respuesta al nitrógeno, *GDH2*, *MEP2* y *DAL5* en la cepa silvestre C9 junto con los mutantes simples *tsa1Δ*, y *gcn2Δ*, y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* en condiciones de envejecimiento cronológico en medio mínimo completo SC y en SC con 1/25 de nitrógeno (-N) mediante qRT-PCR. Los experimentos se realizaron por sextuplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Esta mayor expresión de las permeasas en el mutante *gcn2Δ* se podría explicar ya que al no tener quinasa Gcn2p no activa el factor de transcripción Gcn4p y no se activan los genes de respuesta a al ayuno de nitrógeno pero sí que está activo la ruta de represión por catabolito de nitrógeno implicado otros genes con *GLN3* y *GAT1* que también activan la respuesta a este ayuno. Podría ocurrir también que se activase una nueva respuesta transcripcional a través de la expresión cooperativa entre Gln3p y Gcn4p que podrían explicar este aumento en la expresión de *MEP2* y *DAL5* en el mutante *gcn2Δ* (Hernández et al., 2011).

A continuación se estudió la expresión de estos genes en condiciones de vinificación, en esta ocasión, en mosto sintético MS para poder modular la concentración de nitrógeno asimilable. Las muestras para el análisis de la expresión de los tres genes seleccionados se tomaron, durante la fermentación en MS300, el día 1 y el día 4 de crecimiento, y durante la fermentación en MS75 (con 1/4 de fuentes de nitrógeno asimilables), el día 2 y el día 11 de crecimiento.

En la Figura 2.14 se detallan los resultados obtenidos. Se observa un pequeño aumento de los niveles de mRNA de *GDH2* en la cepa silvestre en mosto sintético a día 4 de crecimiento en este medio MS300, indicando que se produce una disminución o ayuno de nitrógeno.

Resultados y Discusión

En MS75, la cepa silvestre muestra una alta expresión de *GDH2* en el tiempo más corto, t2, y disminución a día 11, sugiriendo que la limitación de N se adelanta y que a t11, cuando se han consumido los azúcares presentes en el mosto, las levaduras se encuentran ya en fase estacionaria, como se muestra en la medida de los azúcares en la Figura 1.3C.

En el caso del mutante *tsa1Δ* se observa los mismos niveles de mRNA de *GDH2* que en la cepa silvestre en MS300. MS75 a día 2, el mutante *tsa1Δ* presenta una expresión de *GDH2* mayor que la cepa silvestre, que disminuye solo ligeramente a t11, manteniendo niveles altos de mRNA. En condiciones de bajo nitrógeno, *tsa1Δ* tiene una mayor percepción del déficit de nitrógeno, tiene un defecto en la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno, lo que hace que aumente la expresión de *GDH2* ya que a día 11 de crecimiento en mosto con poco nitrógeno, los niveles de expresión de *GDH2* se mantienen muy altos comparados con la cepa silvestre.

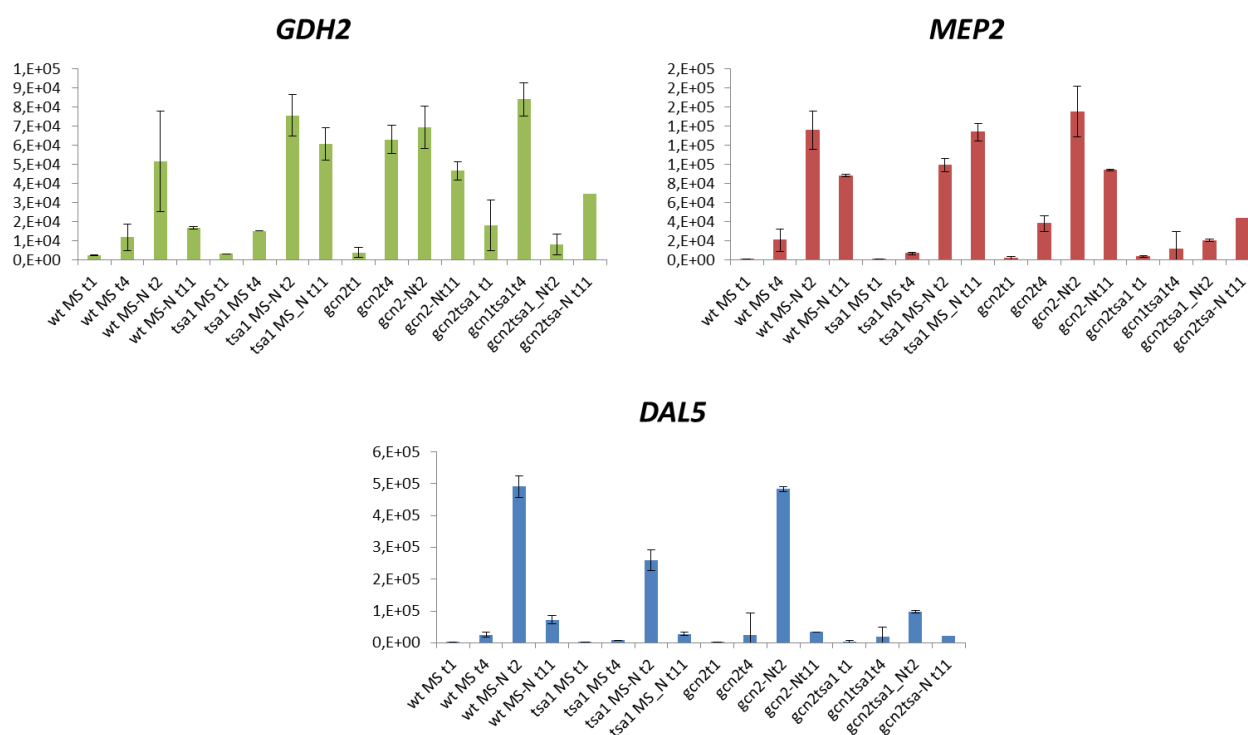


Figura 2.14. Expresión de genes del metabolismo del nitrógeno durante fermentación en mosto sintético. Estudio de la expresión de tres genes de respuesta al nitrógeno, *GDH2*, *MEP2* y *DAL5* en la cepa silvestre C9 junto con los mutantes simples *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y doble *gcn2Δtsa1Δ* en condiciones de vinificación en mosto sintético MS300 y en mosto sintético con 1/4 de nitrógeno MS75 (-N) mediante qRT-PCR. Los experimentos se realizaron por sextuplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

En el mutante *gcn2Δ* a día 1 de crecimiento en mosto sintético apenas se detecta el mRNA de *GDH2*, al igual que ocurre en la expresión en el silvestre y en *tsa1Δ*, pero a diferencia de estas dos cepas, en el mutante *gcn2Δ* hay un aumento en los niveles de expresión de *GDH2* a t4 en MS300 que son similares a los que presenta en mosto con poco nitrógeno.

En mosto sintético con nitrógeno limitante, la expresión de *GDH2* tanto a día 2 como a día 11 de crecimiento es muy alta, reflejando un defecto, igual que el mutante *tsa1Δ*, en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno en este medio.

En cuanto a los niveles de mRNA de *GDH2* en el doble mutante a t1 y t4 de crecimiento en mosto sintético MS300, son similares a los del mutante *gcn2Δ*. Sin embargo, y a diferencia de los mutantes simples, a día 2 de crecimiento en mosto sintético MS75, con bajo nitrógeno, tiene unos niveles muy bajos de mRNA de *GDH2* que aumentan a día 11. Estos resultados del doble mutante vuelven a reflejar la fuerte interacción existente entre *TSA1* y *GCN2* esta vez en un fenotipo completamente diferente como es la regulación de la expresión de genes implicados en la respuesta a disponibilidad de nitrógeno. Si se observa la expresión del gen *MEP2* en MS300, en la cepa silvestre hay una expresión similar a la expresión de *GDH2* es decir, en mosto sintético a día 1 de crecimiento apenas se detecta el mRNA de *MEP2* y a día 4 de crecimiento se activa su expresión. En cambio, en MS75, tanto a día 2 como a día 11 de crecimiento, los niveles de mRNA de *MEP2* son mucho menores. El mutante *tsa1Δ*, al igual que ocurre con la cepa silvestre, a día 2 de crecimiento en MS75 hay un incremento en los niveles de expresión de *MEP2* que incrementa, un poco, a día 11 de crecimiento.

El mutante *gcn2Δ* a día 1 y día 4 de crecimiento en MS300 muestran niveles de mRNA de *MEP2* similares a los de la cepa silvestre. Sin embargo, el doble mutante *gcn2Δ tsa1Δ* presenta niveles bajos de expresión de *MEP2*, si se compara con la cepa silvestre y con ambos mutantes simples. Este resultado, de nuevo, indica una conexión entre *GCN2* y *TSA1* en la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. Por último, se estudió la expresión del gen *DAL5* que resulta ser muy buen indicador de la deficiencia de nitrógeno. En la cepa silvestre, los niveles más altos de mRNA de *DAL5* se observan en condiciones de fermentación en mosto sintético sin nitrógeno, MS75, a día 2 de crecimiento, detectándose menor expresión a día 11. En la cepa mutante *tsa1Δ* ocurre de manera similar, sólo a día 2 de crecimiento en MS75 se detecta expresión del gen *DAL5*, y a nivel más bajo que en la cepa silvestre. En el mutante *gcn2Δ* el perfil de expresión del gen *DAL5* en las condiciones ensayadas es indistinguible el perfil de la cepa silvestre. Sin embargo el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* presenta perfil de muy baja expresión, particularmente llamativa en el t2 de la fermentación en MS75, momento en que tanto la cepa silvestre como los mutantes simples muestran una elevada expresión. De nuevo, este fenotipo del doble mutante sugiere una fuerte interacción genética entre los genes *TSA1* y *GCN2*, que es la conclusión más importante de este apartado dedicado a la expresión génica de marcadores de limitación de nitrógeno en condiciones de envejecimiento cronológico en distintos medios.

2.3. Conexión bioquímica entre *GCN2* y *TSA1*

Una vez demostrada la interacción genética entre *TSA1* y *GCN2* a través de distintas aproximaciones experimentales se planteó el estudio de las bases bioquímicas de dicha interacción.

2.3.1. Estudio de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α

Como primera aproximación, se decidió estudiar el efecto de la delección de *TSA1* en los niveles de fosforilación de la serina 52 del factor de iniciación de la traducción eIF2 α , sustrato de Gcn2p. Estos estudios de fosforilación de eIF2 α , que se describen a continuación, se llevaron a cabo utilizando varias cepas mutantes y en distintas condiciones, tanto de medio de cultivo, como de presencia de compuestos químicos inductores de limitación de nutrientes y de estrés oxidativo.

2.3.1.1 Efecto de compuestos químicos inductores de la actividad de Gcn2p en la fosforilación de eIF2 α

En esta serie de experimentos se realizaron dos tratamientos que aumentan la actividad de Gcn2p y se estudiaron la cepa silvestre C9, los mutantes simples *tsa1 Δ* y *gcn4 Δ* y el mutante de delección de *GCN2*, *gcn2 Δ* , como control negativo. Por un lado, se estudió la inducción de ayuno de nitrógeno a través del uso de 3AT. Como ya se ha comentado anteriormente, el 3AT inhibe a His3p, que cataliza el sexto paso en la biosíntesis de histidina, creando así un ayuno de histidina intracelular, que activa a Gcn2p. Por otro lado, se estudió la respuesta a estrés oxidativo en presencia de H₂O₂ 0.5 mM durante 30 minutos en estado exponencial, tratamiento que ha demostrado inhibir la traducción, aunque hay controversias respecto si esa inhibición es dependiente de eIF2 α y por tanto de Gcn2p (Knutsen et al., 2015; Rajesh et al., 2015). El nivel de fosforilación de eIF2 α se analizó utilizando un anticuerpo anti-ser52eIF2 α comercial, tal como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.4.3). Como se muestra en la Figura 2.15, en condiciones de crecimiento exponencial en medio SC no hay fosforilación de eIF2 α . En condiciones normales de crecimiento exponencial, no se requiere la fosforilación de eIF2 α que es lo que se observa tanto en la cepa silvestre, como en los mutantes *tsa1 Δ* y *gcn4 Δ* . En condiciones de ayuno de histidina por el tratamiento con 3AT, hay fosforilación de eIF2 α pero no se observan diferencias entre las cepas. En cambio, en condiciones de estrés oxidativo en presencia de H₂O₂ 0.5 mM, se observa una banda de fosforilación en eIF2 α en *tsa1 Δ* ligeramente más intensa (19% más intensa que la cepa silvestre), y en el mutante *gcn4 Δ* se observa una intensidad ligeramente menor que en la cepa silvestre. Se puede concluir que las condiciones de ayuno intracelular de nitrógeno inducen la fosforilación de eIF2 α y que esta no se ve afectada por la ausencia de Tsa1p ni tampoco por la de Gcn4p. Sin embargo, la fosforilación de eIF2 α inducida en condiciones de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno sí es cuantitativamente distinta en las cepas analizadas, observándose mayor nivel en el mutante *tsa1 Δ* . Este resultado sugiere que la falta de Tsa1p podría ocasionar una elevación de los niveles intracelulares de peróxido, y con ello una mayor estimulación de la actividad de Gcn2p.

Además aporta evidencia de los mecanismos bioquímicos que podrían explicar la conexión entre *TSA1* y *GCN2*, indicando que la ausencia de *TSA1* puede de alguna manera alterar la maquinaria de inicio de traducción, lo que influiría en la actividad de Gcn2p. Debe existir algún mecanismo de retroalimentación que explique la disminución de actividad Gcn2p en el mutante *GCN4*, mecanismo que solo actúa en condiciones de estrés oxidativo. Gcn4p se ha descrito como un regulador también de la expresión frente a peróxido de hidrógeno (Mascarenhas et al., 2008).

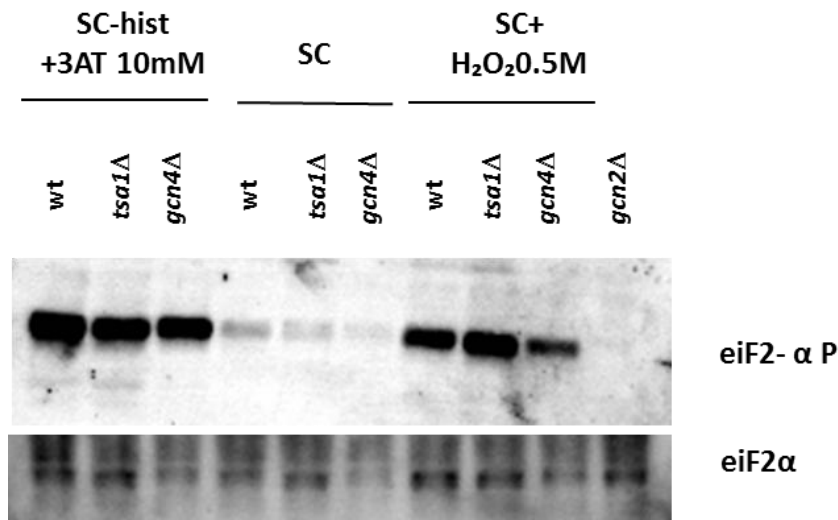


Figura 2.15. Estudio de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α en presencia de activadores de Gcn2p. Estudio mediante western blot de la fosforilación de eIF2- α bajo condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂ 0.5mM y bajo condiciones de ayuno de nitrógeno 3AT 10mM en los mutantes *tsa1* Δ y *gcn4* Δ . Se utilizó un anticuerpo anti-ser52eIF2 α para la detección y un anticuerpo anti-eIF2 α como control de carga.

2.3.1.2 Fosforilación de eIF2 α durante la vinificación en mosto sintético

Se decidió realizar un estudio de la fosforilación del eIF2 α a lo largo de experimentos de fermentación en mosto sintético de la cepa silvestre y el mutante *tsa1* Δ , con el fin de analizar el efecto de la conexión *TSA1-GCN2* sobre este parámetro en las condiciones naturales de las cepas vínicas, analizando el estado nutricional de las levaduras conforme se agotan los nutrientes. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 2.16. A día 1 de crecimiento en mosto sintético, ya se observa fosforilación del eIF2 α en la cepa silvestre, que luego disminuye de nivel a lo largo del tiempo del experimento. Así pues la regulación traduccional es muy rápida, lo cual sugiere que los aminoácidos son rápidamente captados y posiblemente reclusos en la vacuola. Sin embargo, si se analiza la expresión de genes marcadores de respuesta a la disponibilidad de nitrógeno de la Figura 2.14, a día 1 de crecimiento en mosto sintético MS300, no se detecta expresión de los genes marcadores. Dado que intervienen diferentes rutas de señalización y de respuesta, es posible que a día 1 de crecimiento en mosto sintético se produzca ya la activación de *GCN2* y la fosforilación de eIF2 α aunque no se induzcan la NCR.

Si observamos la fosforilación de eIF2 α en el mutante *tsa1* Δ , a día1 de crecimiento hay un nivel de fosforilación considerablemente más alto que en la cepa silvestre (1.96 veces más), lo que puede indicar que en el mutante *tsa1* Δ hay una alteración en la señalización de la disponibilidad de nitrógeno a través de Gcn2p en las primeras horas de vinificación. El patrón de desaparición es el mismo lo que indica que la relevancia de la acción de Tsa1 es muy temprana, cuando el crecimiento y el metabolismo fermentativo están a su máximo nivel. La abundancia de azúcares asegura una correcta represión por glucosa de la respiración, peor podría ser que el oxígeno disuelto en el mosto provoque algún tipo de formación de ROS que hagan necesaria la actividad de Tsa1p. A un día de fermentación no se forman agregados de Tsa1p (datos no mostrados), lo que apunta a un efecto de su función redox.

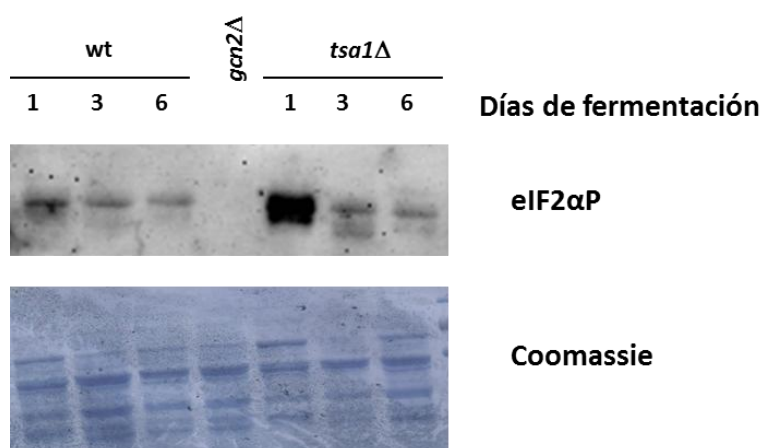


Figura 2.16 Fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α . Estudio mediante *western blot* de la fosforilación de eIF2- α durante la vinificación en mosto sintético MS300 en el mutante *tsa1* Δ .

2.3.2. Estudio de la traducción global mediante perfil de polisomas

Una vez visto el efecto de la delección de *TSA1* en el comportamiento de Gcn2p, necesario para regular el inicio de traducción, analizamos la síntesis de proteínas a otro nivel. Cuando en la fase de elongación de la traducción los mRNAs están asociados con diferentes ribosomas se denominan polisomas que pueden ser fácilmente separados a través de sedimentación por ultracentrifugación de los lisados crudos tratados con cicloheximida para inhibir la traducción y que los ribosomas no se separen del mRNA, tal como se detalla en Materiales y Métodos apartado 3.5 (Foyt et al., 1991; Marcus et al., 1967). Se monitoriza por A_{240nm} y se obtiene un perfil de polisomas, el cual puede ser usado como diagnóstico de muchos aspectos del estado traduccional de la célula, ya que refleja los niveles globales de actividad traduccional celular. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de Mikael Molin y Thomas Nyström durante una estancia en la Universidad de Göteborg.

Dado que, en *S. cerevisiae*, Gcn2p es la única protein quinasa reguladora del factor de iniciación de la traducción eIF2 α , y al observar fuerte interacción genética descrita entre *GCN2* y *TSA1* se decidió estudiar el efecto de ambas mutaciones en la traducción global mediante la obtención de perfiles de polisomas en cultivos en mosto sintético a día 1 y día 4 de crecimiento. En la Figura 2.17 se muestran los perfiles de polisomas, en la parte derecha se muestra el porcentaje de polisomas a día 1 y a día 4 de crecimiento y la relación polisomas/monosomas. A día 1 de crecimiento (Panel A) en mosto sintético, la cepa silvestre C9 presenta un perfil en el que se detecta un 53.7% de polisomas, lo que significa que la traducción global está activa en la cepa silvestre. Si comparamos con perfiles de polisomas en estado exponencial en otros medios, se puede observar la diferencia en el porcentaje de polisomas, que es más alto, indicando una mayor tasa de traducción global.

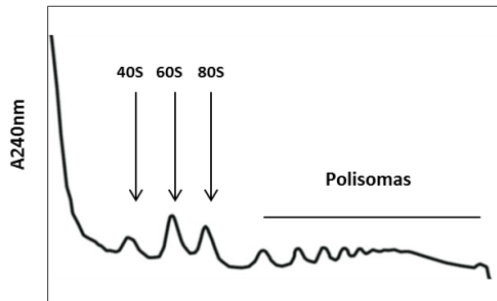
A día 4 de crecimiento (Panel A), cuando se ha parado la división celular y las levaduras se encuentran en fase estacionaria, en la cepa silvestre no se detectan polisomas, por lo que no hay traducción global activa. Estos resultados muestran, por primera vez, los perfiles de polisomas en crecimiento en mosto sintético de una cepa de levadura industrial vínica y que durante la mayor parte de la fermentación que ocurre sin división celular, no hay traducción activa, como ocurre en una fase estacionaria típica, a pesar de haber un metabolismo fermentativo muy activo.

Los perfiles de polisomas del mutante *tsa1* Δ en estas condiciones (Figura 2.19 B) muestran valores de traducción global a día 1 de crecimiento similares a los valores en la cepa silvestre (54), a pesar de que el mutante presenta mayor actividad de Gcn2p a ese tiempo de fermentación, según se deduce de los análisis de fosforilación de eIF2 α de otro experimento de vinificación, ya comentados (Figura 2.16). A día 4 de crecimiento, al igual que ocurre en la cepa silvestre, al no haber división celular, hay muy baja traducción global detectable por el perfil de polisomas y observamos solo un 7% de polisomas. En relación con los datos de fosforilación de eIF2 α , a este tiempo de fermentación se observa ya una caída de su fosforilación (Figura 2.16), lo que probablemente se explica por la secuencia de acontecimientos moleculares que participan en la respuesta puesto que la señal de fosforilación del factor de traducción si que se detecta intensa a día 1 cuando sin embargo, todavía hay traducción global.

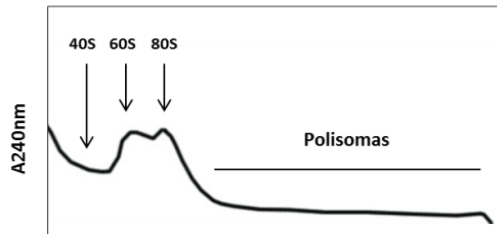
En cuanto al perfil de polisomas en el mutante *gcn2* Δ , a día 1 de crecimiento en mosto sintético presenta un 43% de polisomas, frente al 53.7% de la cepa silvestre, lo que supone una disminución significativa en la traducción global. En ausencia de *GCN2*, no existe la única protein quinasa descrita en *S.cerevisiae* como quinasa de eIF2- α por lo que el inicio de la traducción no estaría inhibido y se esperaría mayor traducción global y, por lo tanto, un mayor porcentaje de polisomas. El perfil de polisomas a día 4 de crecimiento en mosto sintético, es similar a las otras dos cepas, la cepa silvestre y el mutante *tsa1* Δ , dado que todas ellas se encuentran en fase estacionaria o en transición a ella. Los resultados obtenidos globalmente en el estudio de perfiles de polisomas no han permitido obtener conclusiones sobre las posibles funciones en la elongación de la traducción por Tsa1p y, por tanto, tampoco sobre la posible implicación del control de la traducción global en la interacción entre *TSA1* y *GCN2*.

Resultados y Discusión

A



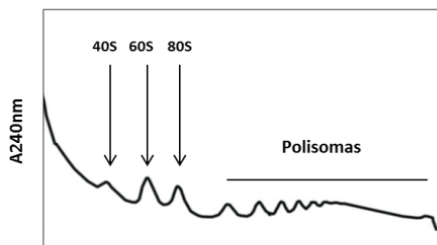
wt día 1



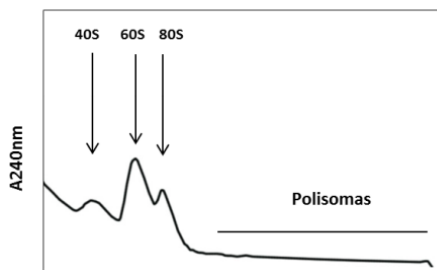
wt día 4

	Polisomas(%)	Polisomas /monosomas
día1	53,7	1,16
día4	13,08	0,32

B



***tsa1*Δ día 1**



***tsa1*Δ día 4**

	Polisomas(%)	Polisomas /monosomas
Día 1	53,96	1,17
Día 4	6,95	0,075

C

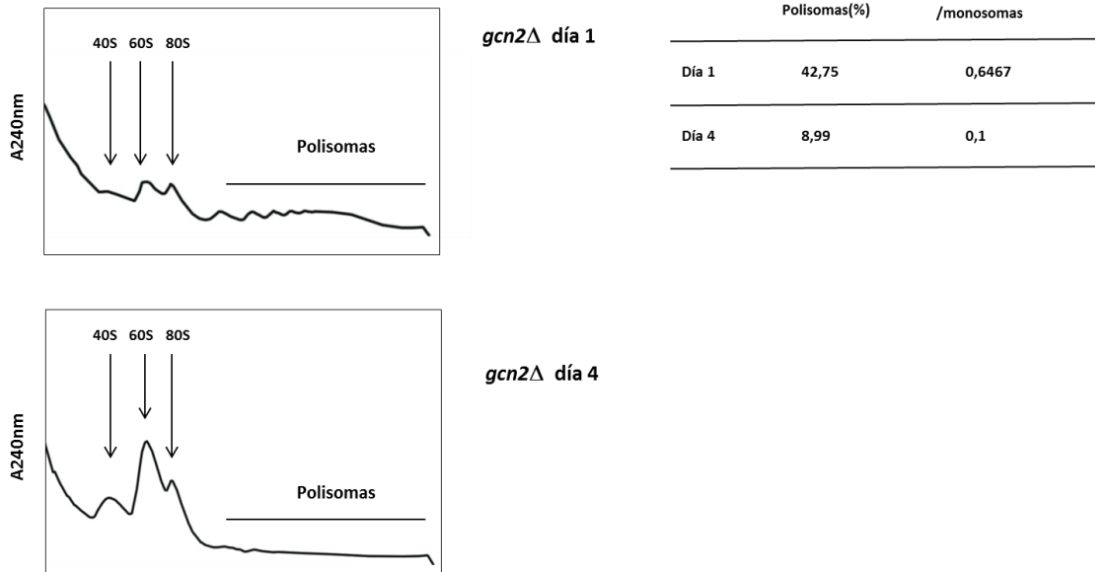


Figura 2.17. Perfiles de polisomas durante fermentación alcohólica en mosto sintético. Se realizó el estudio del perfil de polisomas de la cepa silvestre (A), *tsa1Δ* (B) y *gcn2Δ* (C) a día 1 y día 4 de crecimiento en mosto sintético.

En nuestro laboratorio se están llevando a cabo actualmente estudios preliminares de traducción global utilizando la cepa de laboratorio BY4742 y su mutante de delección en *TSA1* para estudiar el perfil de polisomas en estado exponencial en medio mínimo completo en presencia de un estrés oxidativo por 0.6 mM de H_2O_2 durante 15 minutos. En condiciones de crecimiento exponencial en SC, el mutante en *TSA1* tiene un 79% de polisomas en comparación con la cepa silvestre BY4742 que tiene 83% mientras que, en condiciones de estrés oxidativo, la cepa silvestre tiene un 57.7% de polisomas y el mutante *tsa1Δ* tiene un 41.7% de polisomas, lo que refleja una disminución en la traducción global en el mutante *tsa1Δ* tanto en condiciones de crecimiento exponencial en medio completo SC como con estrés oxidativo.

2.3.3. Estudio de la sulfinilación de Tsa1p

A continuación, se abordó el estudio de la interacción *TSA1-GCN2* desde la perspectiva opuesta, es decir, analizando los niveles de oxidación de la proteína Tsa1p en el mutante *gcn2Δ*, como estrategia complementaria a los análisis de la actividad de Gcn2p en el mutante en *tsa1Δ* que se han descrito en los dos apartados anteriores (2.4.1 y 2.4.2). Tsa1p, como ya se ha comentado, es una peroxirredoxina 2-cys citosólica que presenta dos cisteínas en su sitio activo, encargadas de realizar la función de detoxificación. Una de ellas, es la cisteína situada en la posición 48 de su secuencia, C48, que es la cisteína oxidable y la que permite romper la molécula de peróxido de hidrógeno. Esta cisteína puede oxidarse más allá de la formación de un puente disulfuro, dando lugar a varias formas del azufre que se denominan sobreoxidadas: sulfénico (cuando se une un átomo de oxígeno), sulfínico (cuando son dos) y sulfónico (cuando son 3). La oxidación de la cisteína C48 del estado sulfénico al sulfínico es reversible gracias a la acción de la sulfirredoxina Srx1p, como ya se ha comentado.

Resultados y Discusión

La otra cisteína de Tsa1p, la C171, es la denominada cisteína resolutive que permite devolver la conformación activa de Tsa1p para que pueda ejercer su función. Debido al múltiple papel descrito para Tsa1p, como detoxificadora en condiciones de oxidación y como chaperona con funciones frente a la agregación de proteínas, se decidió estudiar el papel de la sulfinilación de Tsa1p en el mutante *gcn2Δ*.

Como se ha comentado, la sulfirredoxina Srx1p es la encargada de reducir la Cys 48 de Tsa1p para volverla a su estado activo, revirtiendo el estado sulfínico a sulfénico, para que pueda volver a captar otro átomo de oxígeno. Por ello, se utilizó el mutante *srx1Δ* como control positivo de la sulfinilación, ya que en ausencia de Srx1p el estado sulfínico de la cys 48 de Tsa1p es irreversible y se puede detectar mediante el anticuerpo comercial anti-SO₂/SO₃ (Apartado 4.4.3 de Materiales y Métodos). Además del mutante *srx1Δ* como control positivo, se utilizó también el mutante *tsa1Δ* como control negativo.

Se realizó previamente el estudio mediante *western blot* para la cuantificación de los niveles de Tsa1p en la cepa silvestre C9 y en la cepa mutante *gcn2Δ*, en condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ 0.6 mM, durante 15 y 30 minutos. Los resultados se recogen en la Figura 2.18, donde se observa un aumento en los niveles de Tsa1p conforme aumenta la exposición al oxidante H₂O₂, sin detectar diferencias significativas entre las cepas en estudio con excepción, obviamente, del control negativo *tsa1Δ*. Así pues, en estas condiciones oxidantes Gcn2p no altera la traducción de Tsa1p.

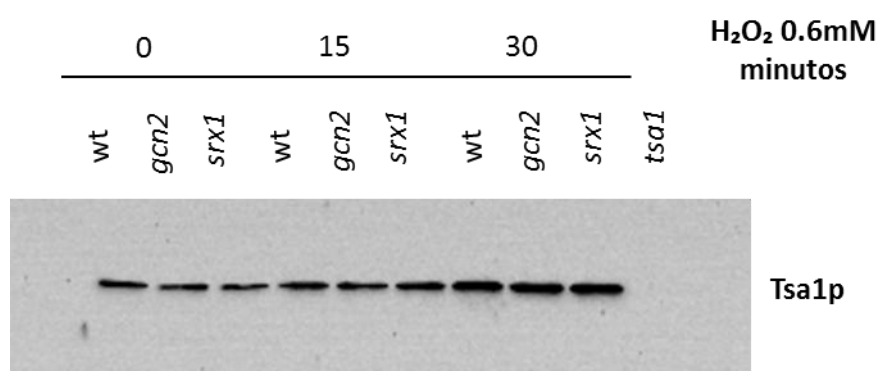


Figura 2.18. Determinación de la acumulación de Tsa1p en el mutante *gcn2Δ* en estrés oxidativo. Detección por western blot de los niveles de Tsa1p bajo condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂ 0.6mM en el mutante *gcn2Δ* y en *srx1Δ* como control positivo de sulfinilación.

En la siguiente Figura 2.19 se muestran los resultados de la detección del estado de sulfinilación, que se analizó en condiciones de envejecimiento cronológico a día 1 y día 3 en ausencia y presencia de estrés oxidativo H₂O₂ 0.6 mM durante 30 minutos, que como se ha observado en la Figura 2.18 hay un mayor nivel de Tsa1p, tal como se describe en el apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos. Se utilizaron dos anticuerpos en una misma membrana de western, anti-Prx que es específico de Tsa1p para control de carga y un anticuerpo que detecta sulfinilación, anti-SO₂/SO₃, que es específico de la oxidación de Tsa1p.

Se usaron anticuerpos secundarios específicos fluorescentes de manera que, en función del canal que se utilice, se detectará el anticuerpo anti-Prx (rojo), el anticuerpo anti-SO₃ (verde) o ambos (amarillo). El panel superior la Figura 2.20 muestra la superposición de la fluorescencia de ambos anticuerpos de manera que se ven en rojo las muestras en las que Tsa1p está presente y con baja o nula sulfinilación, mientras que la intensidad de color amarillo aumenta en relación directa con el grado de sulfinilación. El panel central de la Figura 2.19 muestra únicamente la fluorescencia roja del anticuerpo secundario que reconoce al primario anti-Prx, dando los niveles de Tsa1p (de manera equivalente a la Figura 2.18) que son similares en los 3 mutantes y en las condiciones de estudio, excepto para el mutante *tsa1Δ* que, como control negativo, no hay banda.

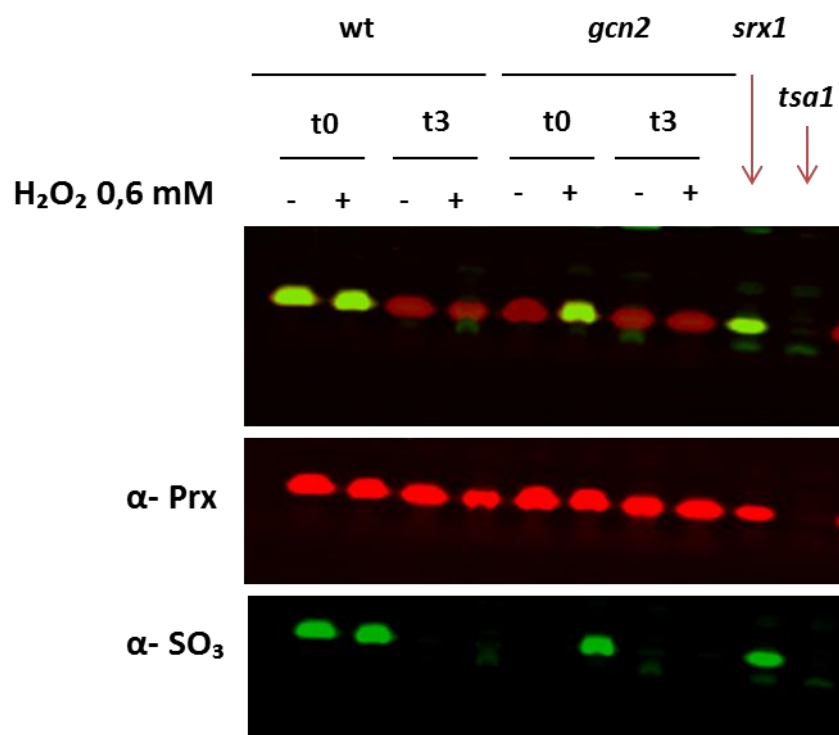


Figura 2.19 Niveles de sulfinilación de Tsa1p en el mutante *gcn2Δ*. Detección por western blot de los niveles de oxidación de Tsa1p mediante el anticuerpo anti-SO₃ en condiciones de envejecimiento cronológico (tiempo 0 y tiempo 3) con y sin H₂O₂ 0.6mM en el mutante *gcn2Δ*.

El panel inferior de la Figura 2.19 muestra únicamente la fluorescencia del anticuerpo secundario que reconoce al primario anti-SO₂/SO₃, dando una cuantificación de Tsa1p oxidada. Como se observa en la Figura 2.19, a t0 de envejecimiento, que corresponde a día 3 de crecimiento en medio mínimo completo SC, en la cepa silvestre hay sulfinilación de Tsa1p tanto sin estrés oxidativo como con estrés oxidativo por H₂O₂ 0.6 mM. Sin embargo, a t3 de envejecimiento que corresponde a día 6 de crecimiento en este medio, no hay sulfinilación.

Resultados y Discusión

Estos resultados indican que cuando las levaduras están entrando en la fase estacionaria han acumulado una serie de daños, provocados por estrés en el crecimiento fermentativo y estrés por la respiración del etanol, que es posible que la forma oxidada haya sido eliminada por proteólisis o haya agregado en complejos insolubles que no se detectan, o la sulfirredoxina actúe a tiempos más largos.

En el caso del mutante *gcn2Δ*, no presenta sulfinilación de Tsa1p a tiempo 0 de envejecimiento, como sí que ocurre en la cepa silvestre, pero sí que se observa a ese mismo tiempo tras 30 min de estrés oxidativo con 0.6 mM de H₂O₂. Por lo que el mutante *gcn2Δ* tiene un defecto en la sulfinilación de Tsa1p a día 3 de crecimiento en este medio. Este resultado se discutirá más adelante. A tiempo 3 de envejecimiento ocurre lo mismo que en la cepa silvestre, no hay oxidación de la cisteínas de Tsa1p.

2.3.4. Estudio del crecimiento en diferentes fuentes fermentables y/o respirables

Dado que la mutación de *Gcn2p* parece jugar un papel en la sulfinilación de Tsa1p durante el crecimiento en SC, pero no en la sulfinilación inducida por estrés oxidativo, se decidió estudiar el crecimiento del doble mutante *tsa1Δ gcn2Δ* en distintos medios y condiciones.

2.3.4.1 Goteos en placa con diferentes fuentes de carbono

Se utilizaron placas de medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono fermentables (como glucosa, fructosa y sacarosa), respirables (como glicerol, etanol, acetato) y placas con galactosa, como azúcar de metabolismo respirofermentativo. Se analizó el crecimiento de la cepa industrial vínica C9 así como de los mutantes simples, *tsa1Δ* y *gcn2Δ* y en el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* así como en *tsa1Δgcn2Δ*, sin mostrar diferencias. Los resultados se muestran en la Figura 2.20, donde se observa que las cuatro cepas pueden crecer perfectamente en medio donde la fuente de energía es la fermentación de los azúcares, glucosa, fructosa y sacarosa. Sin embargo, cuando las fuentes de carbono son respirables, hay un defecto en el crecimiento del doble mutante. Como se observa, en YPEtanol, el mutante *tsa1Δ* presenta un defecto en el crecimiento pero es capaz de crecer mientras que el doble mutante, no. Lo mismo se observa en placas con YPGlicerol. En placas con galactosa el mutante *tsa1Δ* tiene un defecto de crecimiento en este medio y el doble *gcn2Δtsa1Δ* no puede crecer. Dado que los mutantes petite son capaces de crecer en medio cuya única fuente de carbono es la galactosa (Carlson et al., 1981), la incapacidad del doble mutante de crecer en galactosa podría deberse a un defecto en la represión por glucosa y no de la respiración. Para ello se recurrió a placas de sacarosa con glucosamina un análogo de la glucosa que promueve represión por glucosa, pero no es metabolizable.

En este medio se observa un defecto de crecimiento del mutante *tsa1Δ* y el doble mutante es incapaz de crecer en estas condiciones, lo cual indica que el doble mutante tiene una represión por glucosa hiperactivada que le impide utilizar fuentes de carbono alternativas.

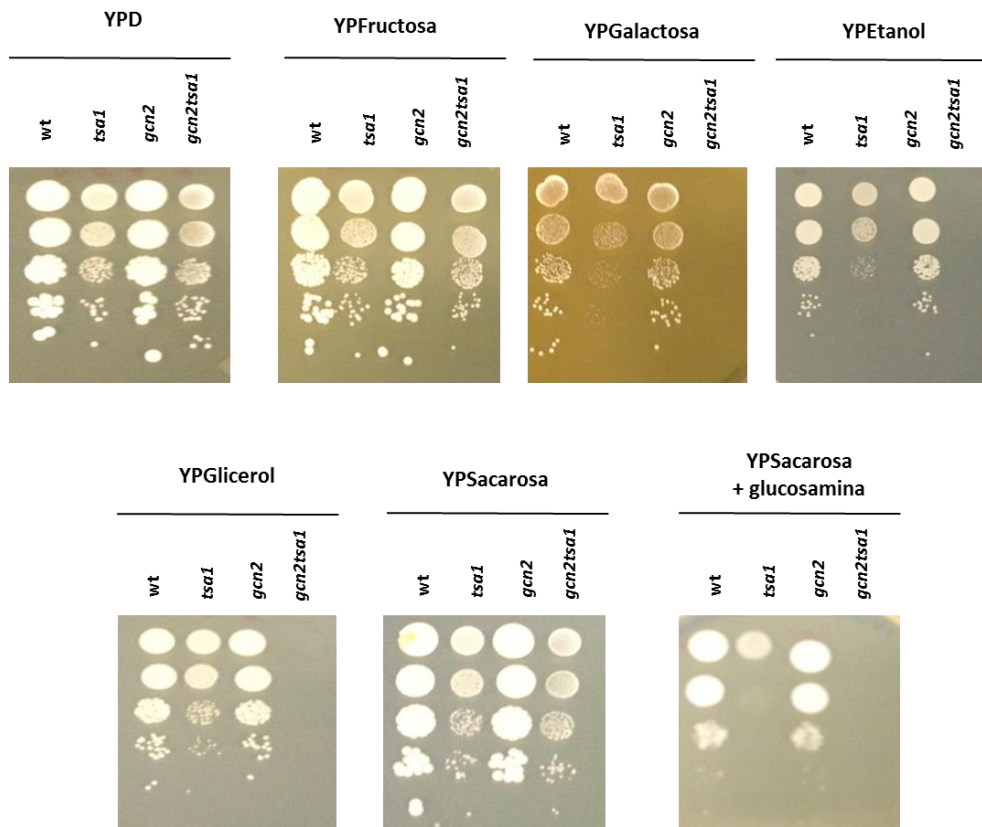


Figura 2.20. Crecimiento mediante goteo en placa de la cepa haploide industrial C9 y los mutantes derivados *tsa1* Δ , *gcn2* Δ y *gcn2* Δ *tsa1* Δ con diferentes fuentes de carbono.

Se realizó también un goteo en placa de la construcción del doble mutante en los genes *TSA1* y *GCN4* para estudiar si el defecto en la respiración o en la utilización de otras fuentes no fermentables por defecto en la represión por glucosa era dependiente de la ruta GAAC, en la que participa Gcn2p, o de funciones asociadas al control de la traducción o a otras funciones no descritas de esta protein quinasa. En la Figura 2.21 A se muestra unos goteos en placa en el medio YPD y en el medio YPGlicerol. Como se puede observar, el doble mutante *tsa1* Δ *gcn4* Δ es capaz de utilizar a través de la respiración, el glicerol. De manera que, el fenotipo observado en el doble mutante *tsa1* Δ *gcn2* Δ es debido a una función diferente de Gcn2p, y no a su función en el GAAC.

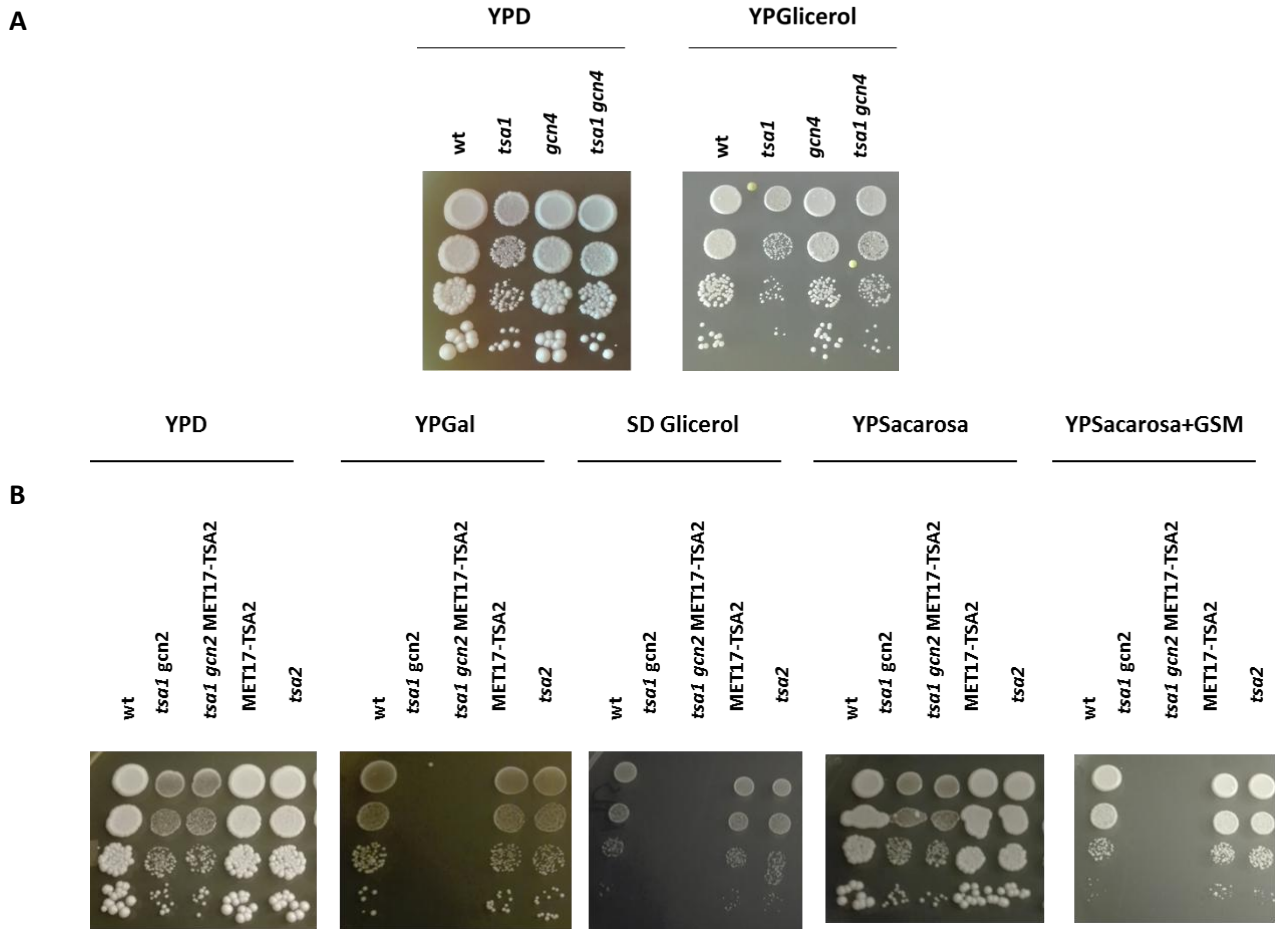


Figura 2.21. Crecimiento mediante goteo en placa de la cepa haploide industrial C9 y los mutantes derivados *tsa1* Δ , *gcn4* Δ y *tsa1gcn4* Δ (A) y con el mutante en *TSA2* y el sobreexpresante con *MET17* en *TSA2* en la cepa C9 y en el mutante *tsa1gcn2* Δ (B) con diferentes fuentes de carbono.

Se realizó también un estudio por goteos con el mutante en la segunda peroxirredoxina citosólica más abundante, *Tsa2p*. Se utilizó la sobreexpresión con el promotor *MET17* (Orozco et al., 2012a) del gen *TSA2* y se construyó cepas sobreexpresantes en la levadura vínica C9 así como en el doble mutante de *tsa1gcn2* Δ para comprobar que el defecto de crecimiento del *tsa1gcn2* Δ en fuentes de carbono respirable no se tratase de un defecto común en las peroxirredoxinas. En la Figura 2.21 B se muestra los goteos de las cepas mutantes y sobreexpresantes en placas con galactosa, glicerol, sacarosa y sacarosa con glucosamina. La sobreexpresión de la peroxirredoxina *TSA2* no revierte el fenotipo de crecimiento en fuentes de carbono respirables del *tsa1gcn2* Δ .

2.3.4.2 Viabilidad y consumo de etanol en *gcn2Δtsa1Δ*

Como se observa en los goteos, existe un defecto en la respiración del doble mutante. Como se ha comentado a lo largo de la tesis, en el envejecimiento cronológico en medio SC se toma el día 3 de crecimiento como el 100% de viabilidad a partir del cual, se calcula el porcentaje de unidades formadoras de colonias con el paso del tiempo. Si se observa la viabilidad del doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* en medio SC del inicio del capítulo, Figura 2.1, se ve una caída en la supervivencia en el doble mutante en este medio que podría ser debida a este defecto en la respiración. Se decidió comprobar el crecimiento y el perfil de producción/consumo de etanol en medio SC durante los días iniciales, resultados que se muestran en la Figura 2.22. El mutante *gcn2Δ* tiene un crecimiento similar a la cepa silvestre, el mutante *tsa1Δ* tiene un crecimiento menor que la cepa silvestre y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* tiene un defecto en el crecimiento y, además, se observa un rápido decaimiento de densidad celular a partir del día 2 de cultivo (Panel A).

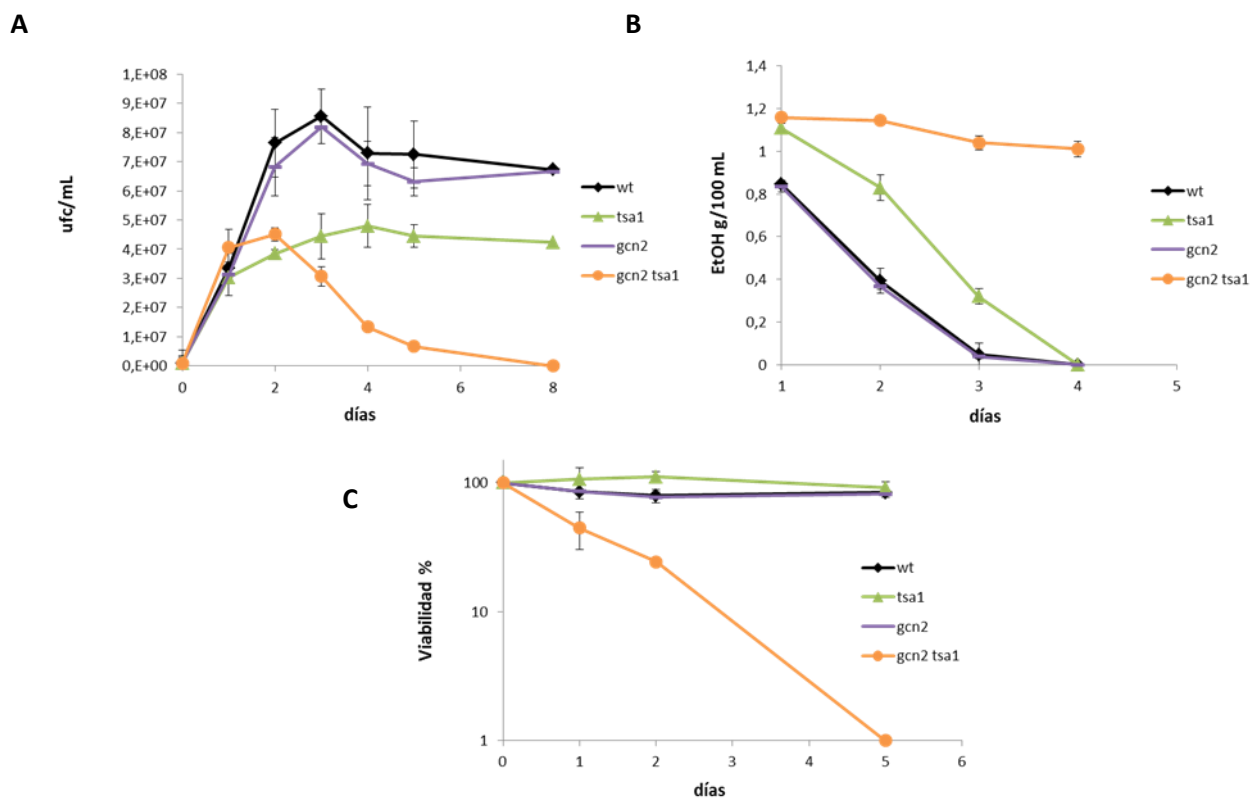


Figura 2.22. Comportamiento del doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* durante el crecimiento, el cambio diauxico y la entrada en fase estacionaria en medio SC. Crecimiento en unidades formadoras de colonia en medio mínimo completo (SC) de *tsa1Δ*, *gcn2Δ* y *gcn2Δtsa1Δ* (A). Medida del etanol en g/100mL durante el crecimiento en SC (B). Curva de supervivencia, tomando el día 3 de crecimiento del panel A como 100% de viabilidad (C).

En todos los casos la glucosa se consumió totalmente a las 24 horas (datos no mostrados), por lo que se midió el etanol en el medio de cultivo a partir del día 1 y a lo largo de todo el crecimiento (Figura 2.22B). El mutante *gcn2Δ* tiene un consumo del etanol similar al de la cepa silvestre acabando de consumirlo a día 3 de crecimiento. El mutante *tsa1Δ* tiene un consumo del etanol más ralentizado que termina de consumirse a día 4 de crecimiento y el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* tiene seriamente afectado el consumo de etanol. Este defecto en el consumo del etanol podría explicar la rápida caída de la viabilidad de dos formas, por un lado el etanol es necesario para obtener energía durante la fase estacionaria a través de la respiración y por otro lado es un agente pro-envejecimiento.

2.3.5 Estudio de mutantes puntuales en las cisteínas catalíticas de Tsa1p y su conexión con GCN2

Disponer de mutantes puntuales en las cisteínas relevantes de Tsa1p nos permite dilucidar la relevancia de cada actividad de la peroxirredoxina en un determinado fenotipo. Se utilizaron los mutantes en *GCN2*, *TSA1* así como los mutantes puntuales en las cisteínas de Tsa1p realizado a través de la técnica del delitto perfecto (Stuckey et al., 2011) en la cual se cambia las cisteínas oxidable y resolutive, C48S y C171S respectivamente construidos en la cepa de laboratorio BY4742 por Mikael Molin para estudiar la longevidad cronológica (Molin et al., 2011). Se combinaron tanto las mutaciones puntuales en el gen *TSA1* como la delección *tsa1Δ* con la mutación de *GCN2* de la cepa BY4742.

2.3.5.1 Longevidad cronológica en medio SC

Se estudió en primer lugar la longevidad cronológica para comprobar si se comportaban igual que las levaduras vínicas y si alguna de las cisteínas de Tsa1p era la responsable del fenotipo observado en la viabilidad del doble mutante *tsa1Δgcn2Δ*. En la Figura 2.23 se observa las curvas de envejecimiento en medio SC. La delección de *GCN2* extiende la longevidad cronológica, pero la delección de *TSA1* no muestra diferencias significativas con la cepa parental. Sin embargo el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* tiene un defecto en la viabilidad que cae muy pronto aunque no tan drásticamente como en la cepa industrial vínica C9 (Figura 2.1), pero se confirma la interacción genética entre ambos genes. En cuanto a los mutantes puntuales de las cisteínas de Tsa1p, el mutante simple en la cisteína 48, *C48S*, tiene una rápida caída en la longevidad cronológica siendo más drástica cuando se combina con la delección en *GCN2*. Este resultado, es similar al que se observa en la cepa vínica donde el doble mutante *gcn2Δtsa1Δ* tiene una viabilidad muy reducida. Estos resultados podrían indicar, que es la cisteína C48 la que parece tener una conexión con *GCN2*.

El hecho de que la delección de *TSA1* no causa esta dramática caída como el mutante puntual en la cisteína peroxidática, podría explicarse por la activación de mecanismos de compensación que se activarían para compensar este defecto. La versión no funcional de Tsa1 C48S podría asociarse con ribosomas, alterando su función o impidiendo su protección frente a daño oxidativo. Ese defecto en traducción se vería agravado en el mutante *GCN2*.

Por otro lado, si se observa el mutante puntual en la cisteína 171, *C171S*, presenta una extensión de la longevidad cronológica. Podría ser que al tener activa la C48 capte oxígeno y esté superoxidada ya que no puede resolver este estado de oxidación, promoviendo el aumento de la forma chaperona de Tsa1p, lo que aparentemente protegería la célula en fase estacionaria. Esta protección requeriría de la acción de Gcn2p, ya que en el doble mutante no se produce esa extensión de la LC, lo que sugeriría una función de Gcn2p es la multimerización de Tsa1p. Por tanto, ambas cisteínas de Tsa1p, la peroxidática y la resolutoria, están implicadas en la interacción con *GCN2* y modulan la longevidad cronológica.

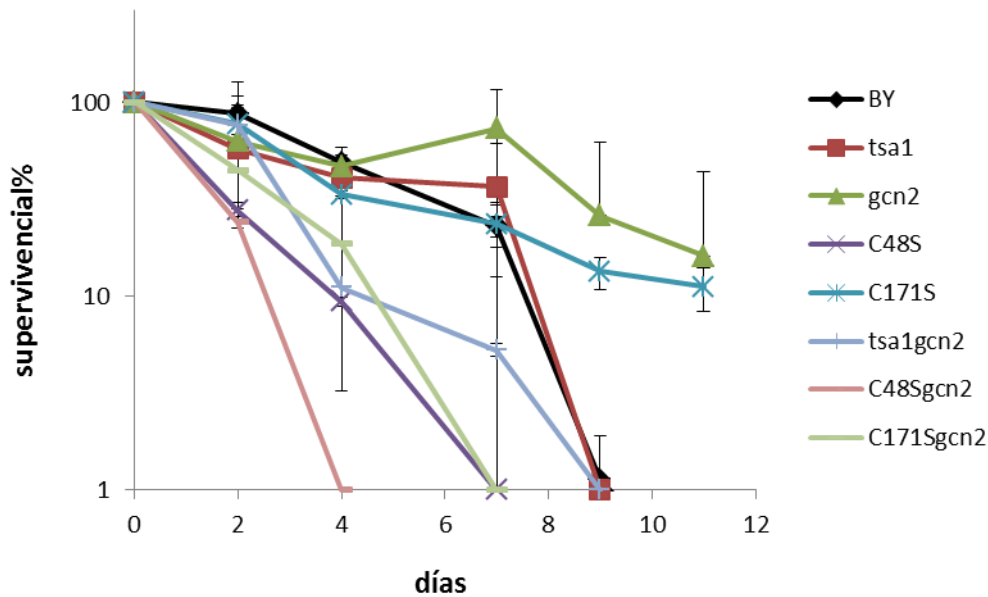


Figura 2.23. Envejecimiento cronológico en los mutantes puntuales en las cisteínas de Tsa1p en cepa de laboratorio y su conexión con *GCN2*. Se tomó el día 3 de crecimiento en medio SC como 100% de viabilidad. Los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran las barras de error de la DT.

2.3.5.2 Goteos en placa con diferentes fuentes de carbono en cepas de laboratorio

Debido al fenotipo de crecimiento observado en las diferentes fuentes de carbono fermentables y respirables en el doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* en la cepa haploide industrial C9, se decidió realizar estos experimentos también con las cepas de laboratorio con las mutaciones puntuales de Tsa1p. Para ello se utilizaron las cepas ya mencionadas en el fondo genético BY4742, que incluyen las mutaciones puntuales, así como las construidas en la cepa de laboratorio BQS252, que deriva de la cepa diploide FY1679 (con el mismo fondo genético que BY4742 y auxotrofa únicamente para uracilo, lo que facilita el estudio de la influencia del nitrógeno en su comportamiento). Los resultados se recogen en la Figura 2.24. Cabe destacar, el defecto de crecimiento en el mutante puntual de la cisteína 48 de Tsa1p en prácticamente todos los medios analizados (Figura 2.24), que concuerda con su disminuída longevidad cronológica en medio SC, Figura 2.23.

Resultados y Discusión

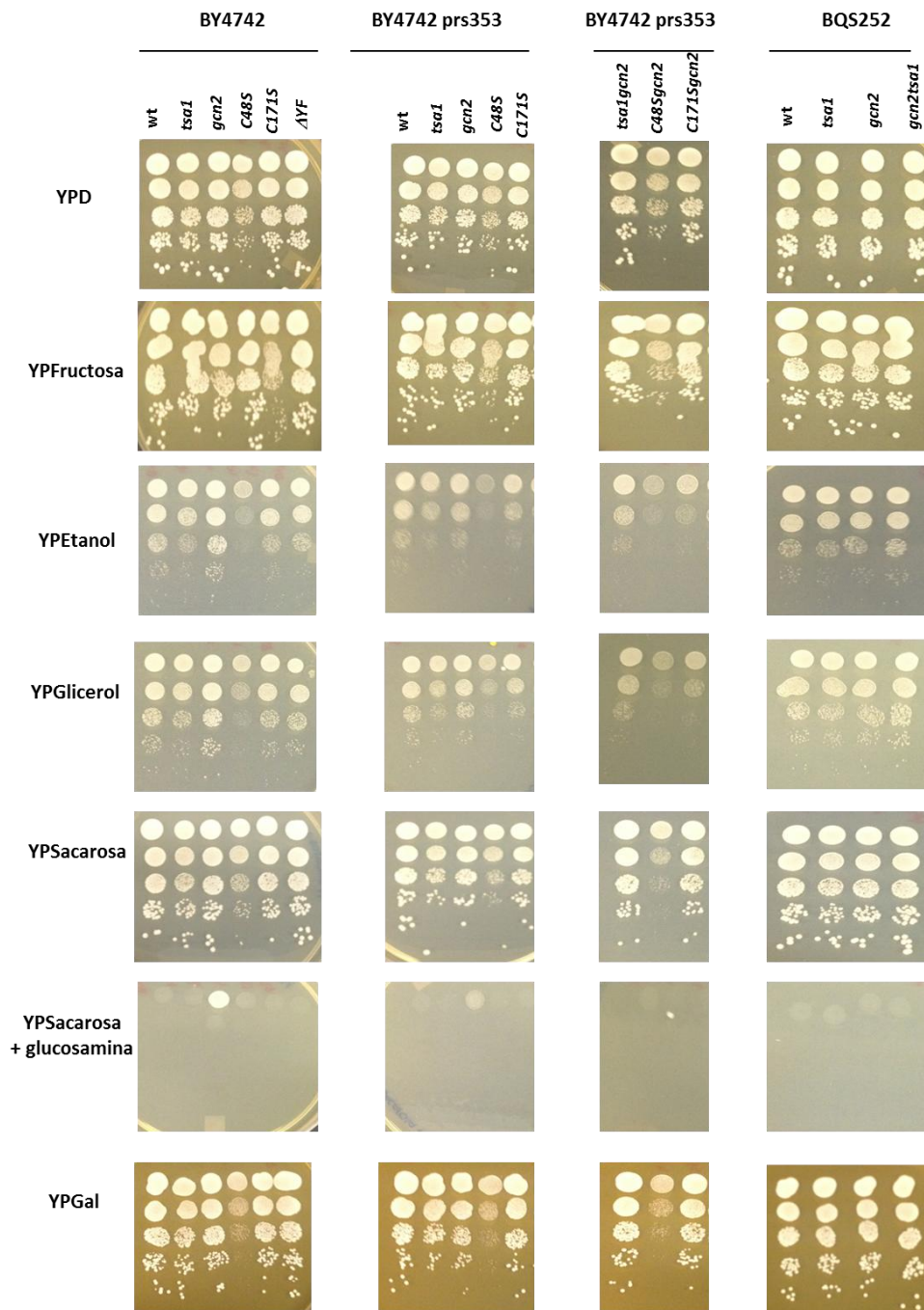


Figura 2.24. Crecimiento en placas con diferentes fuentes de carbono de los mutantes *tsa1* Δ , *gcn2* Δ , *gcn2* Δ *tsa1* Δ y los mutantes puntuales en *Tsa1p* en las cepas de laboratorio BY4742 y BQS252.

Como se puede observar, tanto en la cepa de laboratorio BY4742 como en la cepa BQS252 el doble mutante *tsa1* Δ *gcn2* Δ no presenta defecto de crecimiento en fuentes de carbono respirables, como ocurría en la cepa vínica C9. De manera, y como conclusión, se puede remarcar que el defecto de crecimiento en fuentes de carbono respirables del *tsa1* Δ *gcn2* Δ sólo ocurre en cepas de levadura industriales. La observación de las placas de YPSacarosa con glucosamina nos da indicios de la elevada represión por glucosa en cepas de laboratorio respecto a las vínicas (Fig 2.20).

Esto indica que efectivamente hay divergencias en la respuesta a nutrientes que condicionan la relevancia de las rutas en cuanto a crecimiento y longevidad en distintos tipos de levaduras, todas ellas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*

2.4 Interacción de la ruta de señalización de respuesta a nutrientes PKA con el control general de aminoácidos y la respuesta a estrés

Dentro de la respuesta a disponibilidad de nutrientes, la ruta Ras/cAMP/PKA es la principal vía de control en respuesta a fuente de carbono fermentable. En presencia de glucosa, Ras activa a la adenilato ciclasa Cyr1p, que hace aumentar el nivel de cAMP, activando así a la proteína quinasa A, PKA (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 glucógeno y trehalosa, y se inhibe la transcripción de genes de respuesta a estrés mediada por los factores de transcripción Msn2/4p. En base al uso de mutantes con actividad constitutiva de la ruta, como el mutante en la fosfodiesterasa de cAMP, Pde2p, se ha demostrado la conexión de esta otra ruta de señalización de nutrientes con la resistencia a estrés oxidativo por H₂O₂, que resulta muy inferior en esos mutantes. En esa conexión están también implicadas la peroxirredoxina Tsa1p y la sulfirredoxina Srx1p, y esta última de manera dependiente de Gcn2p a través de su control de la traducción (Molin et al., 2011). Además, también se ha descrito la función de Tsa1p como chaperona implicada en procesos que provocan la formación de agregados proteicos, como el estrés oxidativo y las paradas de traducción, y ha sido colocalizada con la disagregasa Hsp104p (Trotter et al., 2008).

Debido al papel de Tsa1p en la respuesta a estrés, en la restricción calórica a través de PKA, así como su papel como chaperona, se decidió estudiar la conexión entre *TSA1*, *GCN2*, *PDE2* y *RPN4*. Rpn4p es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes del proteasoma, y se ha descrito que el mutante en *RPN4* tiene una menor actividad PKA. El estudio de esta mutación se complementará con la del mutante en *PDE2*, que tiene una actividad PKA mayor (Molin et al., 2011). Además ha sido descrita la conexión de *PDE2* con *TSA1* en longevidad replicativa y de *PDE2* con *UBR2* (ubiquitin ligasa que tiene a Rpn4p como sustrato) (Andersson et al., 2013; Ju et al., 2007; Kruegel et al., 2011). En la Figura 2.26 se representa la longevidad cronológica de los mutantes de delección simples y dobles construídos en la cepa. Como se puede observar, *rpn4Δ* presenta la menor longevidad cronológica de todas las cepas analizadas, de forma consistente con su baja longevidad replicativa (Kruegel et al., 2011). En el mutante *tsa1Δ* su longevidad cronológica cae a día 7 de envejecimiento por debajo de la cepa silvestre, en cambio la delección en *GCN2* causa una extensión de la longevidad, al igual que la delección en *PDE2*.

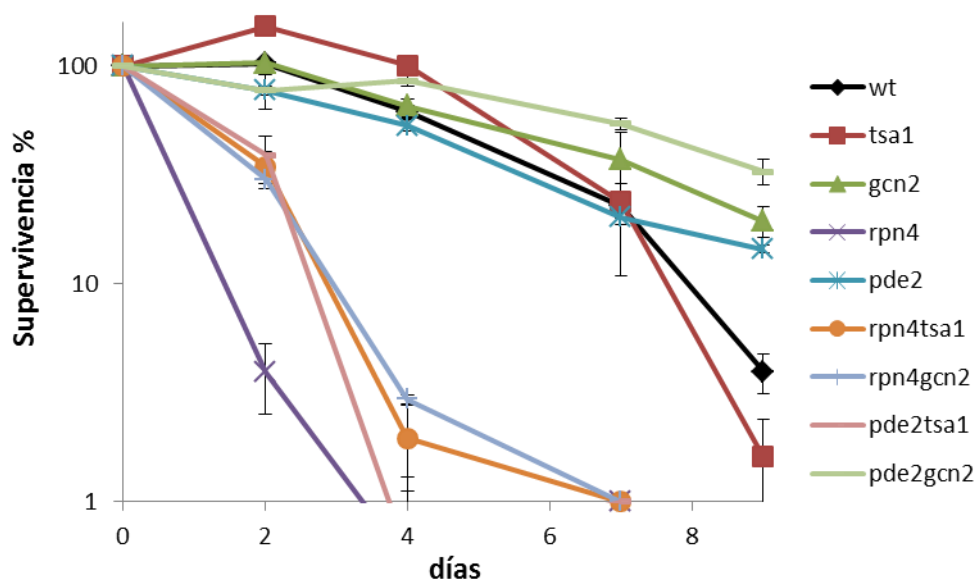


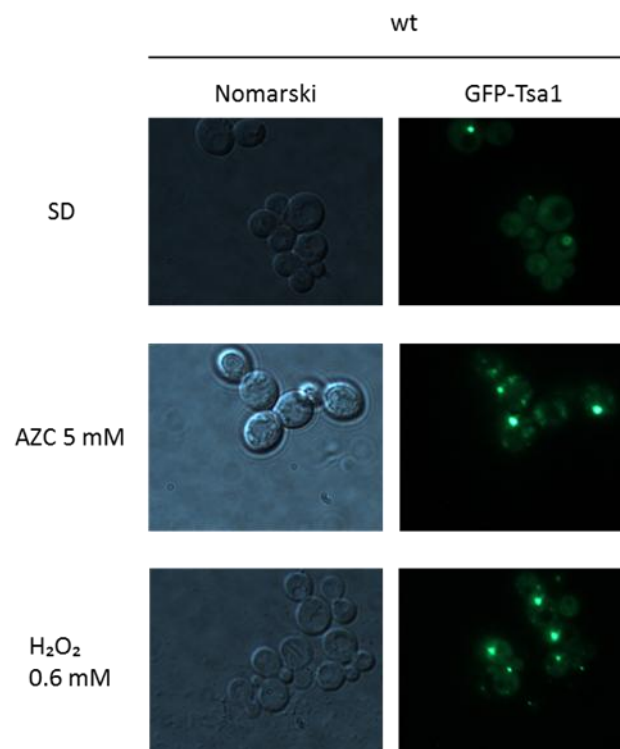
Figura 2.26. Longevidad cronológica de los mutantes *gcn2Δ*, *tsa1Δ*, *rpn4Δ*, *pde2Δ*, *rpn4Δ tsa1Δ*, *pde2Δtsa1Δ*, *pde2Δgcn2Δ* y *pde2Δtsa1Δ* en medio SC tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Al observar los dobles mutantes, las construcciones con la delección de *RPN4* presentan una caída en su longevidad cronológica similar a la del mutante simple *rpn4Δ*, tanto *rpn4Δtsa1Δ* como *rpn4Δgcn2Δ*, a pesar de que los mutantes simples, *tsa1Δ* y *gcn2Δ*, presentan alta supervivencia. Las interacciones de *PDE2* con *TSA1* y con *GCN2* son complejas. Cuando se combina la delección de *PDE2* con la de *TSA1* se observa una caída importante de la longevidad cronológica, indicadora de una interacción fuerte, que produce un fenotipo contrario al de las dos mutaciones simples, ya que los dos mutantes *pde2Δ* y *tsa1Δ* presentan supervivencias altas, incluso aumento de longevidad respecto de la cepa silvestre. Sin embargo, al combinar la delección de *PDE2* con la de *GCN2* observamos una extensión aditiva de la longevidad cronológica de los mutantes simples. Aunque de difícil interpretación, los resultados obtenidos ratifican las conexiones entre la ruta de señalizaciones por nutrientes PKA-AMPC a través de la fosfodiesterasa Pde2p, la peroxirredoxina Tsa1p, la quinasa de la ruta de control de aminoácidos, Gcn2p y el factor de transcripción de respuesta al proteasoma Rpn4p.

Debido a la conexión con el proteasoma a través de Rpn4p, se etiquetó Tsa1p con GFP para observar la posible formación de agregados de Tsa1p en condiciones de estrés por agregación de proteínas mediante el uso de 5 mM de AZC (ácido azetidín-2-carboxílico) (Weids and Grant, 2014) y en presencia de estrés oxidativo con H_2O_2 0,6 mM. Como se puede observar en la figura 2.27 no hay diferencias significativas en la agregación de Tsa1p frente al tratamiento con ninguno de estos compuestos entre la cepa silvestre y las cepas mutantes. En células en fase exponencial en cultivo en SD se observa, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *pde2Δ* y *rpn4Δ* que la fusión Tsa1p-GFP se encuentra muy localizada (B y C).

Cuando visualizamos las células 2 horas después del tratamiento con AZC, se observan agregados de Tsa1-GFP y no hay diferencias en la formación de agregados en presencia de este compuesto. En cuando el tratamiento con H₂O₂ 0,6 mM durante 30 minutos, entre la cepa silvestre y el mutante *rpn4Δ* no hay diferencias pero en el mutante *pde2Δ* parece que hay una mayor cantidad de Tsa1-GFP. En base a los resultados obtenidos en estos estudios de la agregación de Tsa1p en diferentes mutantes y condiciones, podemos concluir que las interacciones entre *RPN4* y *TSA1* y entre *PDE2* y *TSA1*, que disminuyen la longevidad cronológica de los dobles mutantes *rpn4Δtsa1Δ* y *pde2Δtsa1Δ* no está relacionada con la formación de agregados de Tsa1p en condiciones de estrés.

A



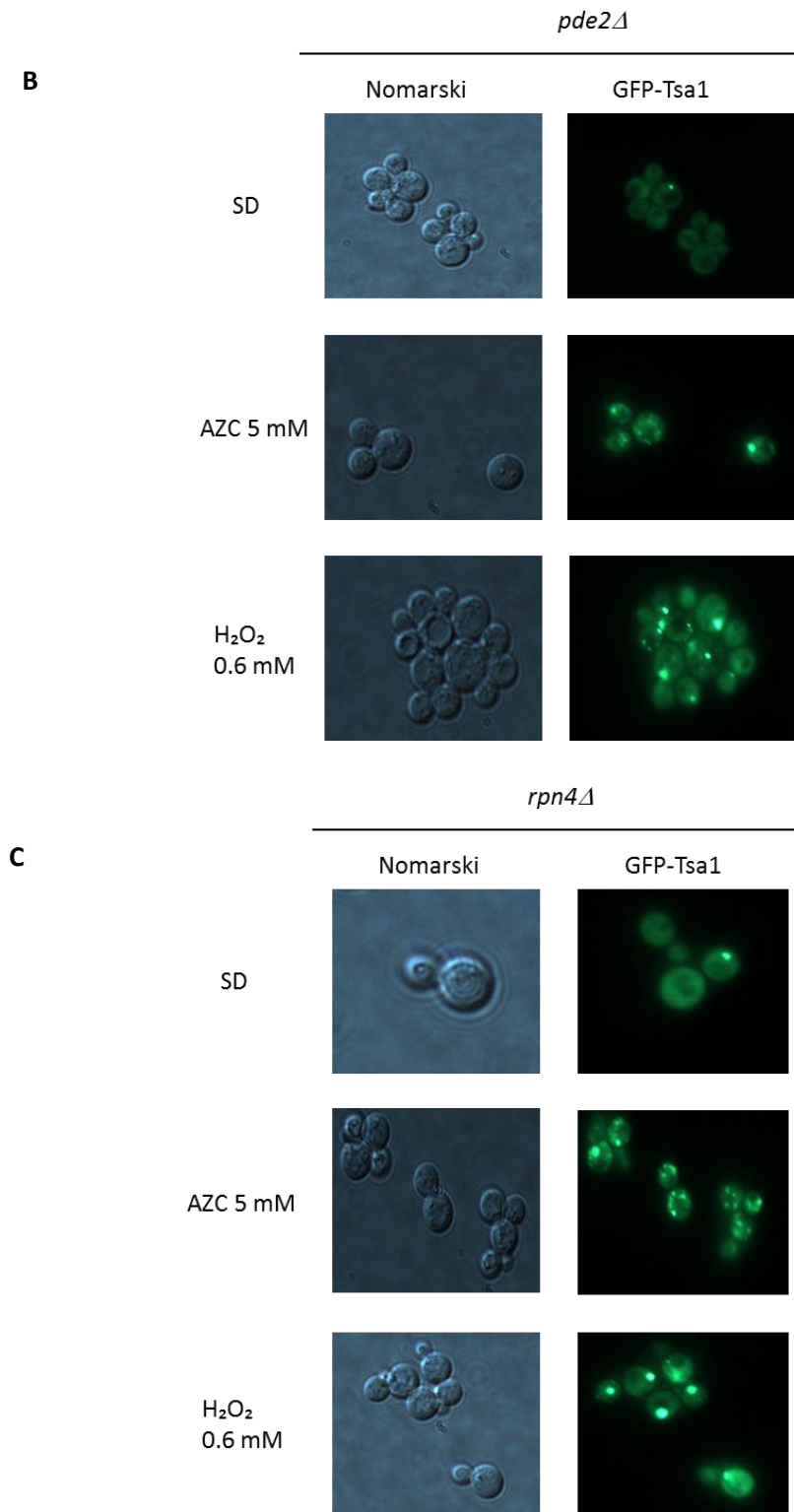


Figura 2.27 Estudio de la agregación de Tsa1p en los mutantes *pde2Δ* y *rpn4Δ*. Visualización de la agregación de Tsa1p a través de la construcción de una fusión Tsa1p-GFP en presencia del inhibidor de la traducción AZC 5mM durante 2 horas y en estrés oxidativo con H₂O₂ 0.6 mM durante 30min en la cepa silvestre C9 (A) *pde2Δ* (B) y *rpn4Δ* (C).

Recientemente se ha establecido la necesidad de la ubiquitin ligasa de la ruta PKA, Ubr2p para la respiración del glicerol, además de su esencialidad para la ubiquitinización y degradación de *RPN4* (Ho et al., 2017). Debido a la deficiencia del mutante *ubr2Δ* para respirar el glicerol, se realizaron experimentos de goteos con los mutantes en *RPN4*, *PDE2* así como en los dobles mutantes de estos con los mutantes en *TSA1* y *GCN2* en diferentes fuentes de carbono, tanto fermentable como respirable, de los mutantes simples y los dobles.

En la figura 2.28 se muestra el crecimiento en placa de las diferentes cepas y en los diferentes medios. Como se puede observar *tsa1Δ* presenta menor crecimiento en los medios de carbono respirables (glicerol, etanol, acetato y galactosa). *pde2Δ* no muestra diferencias en el crecimiento con las diferentes fuentes de carbono mientras que *rpn4Δ* es incapaz de crecer en medios donde la única fuente de carbono es fermentable. Este fenotipo, se recupera cuando se combina la delección de *RPN4* con *TSA1* y con *GCN2*, demostrando también en este fenotipo la interacción una conexión de *GCN2* y *TSA1* con la proteína Rpn4p que regula la expresión de genes en respuesta al proteasoma. Como se ha comentado, Ubr2p es necesaria para la respiración en glicerol, además de para ubiquitinar y degradar a Rpn4p. Que un mutante en *RPN4* no pueda respirar en glicerol podría ser debido a que, de alguna manera, los niveles de Rpn4p se regulan a través de su ubiquitinización por Ubr2p y al no estar *RPN4* no habría esta regulación y no podrían crecer en fuentes de carbono respirables. Por otro lado, que este defecto en la respiración del mutante en *RPN4* se recupere con la delección de *TSA1* y de *GCN2* por un lado nos vuelve a conectar a Tsa1p y Gcn2p en un papel en la respiración y por otro lado, conecta a ambas proteínas con Rpn4p y la ruta PKA.

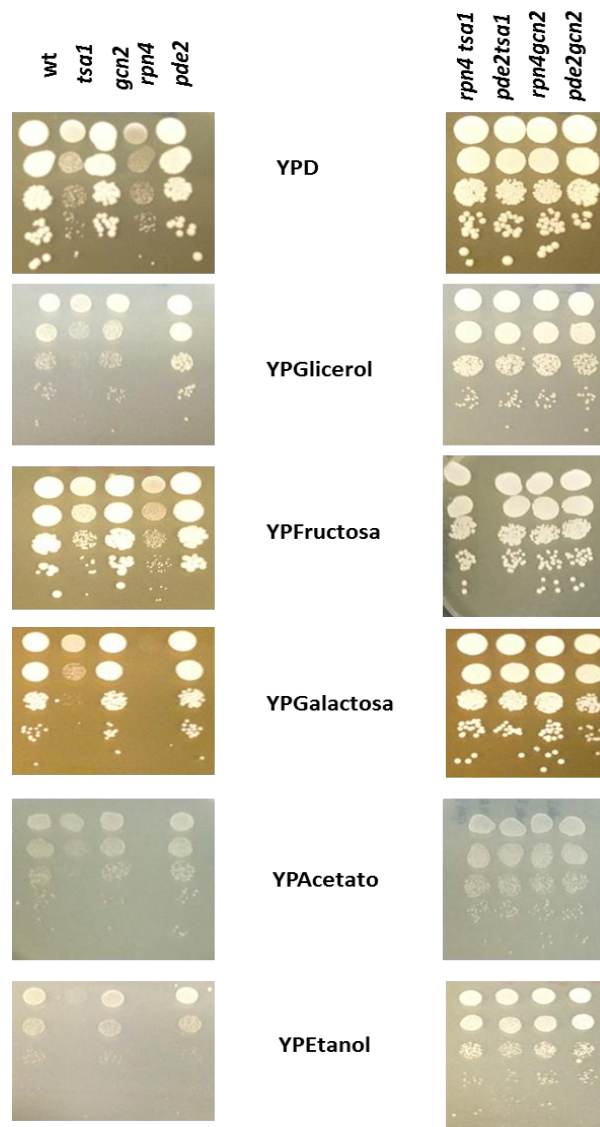


Figura 2.28 Goteos en diferentes fuentes de carbono. Crecimiento en placa con diferentes fuentes de carbono fermentables 2% glucosa (YPD), 2% fructosa (YPF); respirables 2% glicerol (YPG), 2% etanol (YPEt), 2% acetato (YPAc), y respirofermentable, 2% galactosa (YPGal).

Se ha estudiado el papel de las peroxirredoxinas de *S. cerevisiae* en el contexto del envejecimiento biológico. Se deletaron los genes de las peroxidases Ahp1p y Dot5p, dos enzimas dedicadas a la eliminación de alquilhidroperóxidos, citosólica y nuclear, respectivamente. Su delección no promueve el envejecimiento en condiciones estándar. Sin embargo cuando se deleta el gen *TSA1*, la principal peroxirredoxina implicada en la eliminación de H₂O₂, sí que se detecta una caída en la longevidad cronológica. Estos resultados parecen sugerir que en condiciones de aireación el peróxido de hidrógeno podría ser un determinante del envejecimiento celular, mientras que los alquilhidroperóxidos no parecen ser tan determinantes para dicho fenotipo.

Sin embargo la delección de *AHP1* y *DOT5* sí que reducen la LC en condiciones de fermentación vínica, sugiriendo que en estas condiciones sí que producen un nivel de dichos peróxidos suficientemente elevado como para comprometer la viabilidad celular.

Aunque es bien conocido el papel de la restricción dietaria en la extensión de la longevidad, y es también muy relevante en envejecimiento la maquinaria antioxidante, pocas son las evidencias experimentales que ligan ambos procesos. En condiciones de envejecimiento replicativo se ha determinado que la quinasa Gcn2p de la GAAC controla los niveles de proteína de la sulfirredoxina Srx1p, lo que influye en la actividad de la peroxirredoxina Tsa1p y en la longevidad (Molin et al., 2011). En este capítulo hemos determinado que el efecto contrario también se produce, y que Tsa1p condiciona la actividad de Gcn2p. Cuando se deleta *TSA1* se aumenta el nivel de fosforilación de eIF2 α por Gcn2p, ligeramente en condiciones de estrés oxidativo y más intensamente durante la fermentación vínica. Para analizar si existe algún tipo de interacción genética entre ambos procesos durante el envejecimiento cronológico se combinaron las delecciones de las peroxirredoxinas con la de *GCN2*. Y efectivamente existe una fuerte interacción entre *tsa1 Δ y *gcn2 Δ que incrementa dramáticamente el envejecimiento cronológico y que ha sido analizada a lo largo del capítulo.**

Dicha interacción no se producía en el mismo sentido en las alquil hidróxido peroxirredoxinas, indicando un mecanismo específico de acción. El doble mutante es más sensible a oxidantes como peróxido de hidrógeno y menadiona (un generador de superóxido). Esto encajaría fácilmente en la teoría clásica del envejecimiento por radicales libres, ya que una menor tolerancia a estrés oxidativo debería llevar asociada una caída de longevidad. Sin embargo eso no ocurre con otro oxidante como es la diamida, que oxida tioles, de manera que la interacción génica debe suponer un mecanismo especial de protección y no una mera bajada de la respuesta a estrés. Se ha considerado el mecanismo de funcionamiento de Tsa1p para intentar dilucidar su influencia en el envejecimiento. La delección de la sulfirredoxina *SRX1* extiende la LC en medio SC. Dicha mutación dificultaría la actividad peroxidasa de Tsa1p, pero favorecería su actividad de carabina molecular, que podría ser clave en fase estacionaria. Gcn2p tendría pues una función no aún descrita en la protección por agregados que incrementaría el fenotipo de la delección de *TSA1*. Los mutantes puntuales en las cisteínas relevantes parecen apoyar esta hipótesis, ya que la longevidad del mutante en la cisteína peroxidática C48 es baja, mientras que la mutación de la cisteína resolutive C171, que no es necesaria para la agregación de Tsa1p y de su actividad chaperona, muestra una longevidad extendida.

Dicha interacción genética es dependiente de las condiciones de crecimiento, ya que no se observa durante la fermentación vínica. Como ya hemos comentado en el capítulo anterior, la diferente proporción carbono/nitrógeno entre el medio SC y el mosto modula el efecto en la longevidad de determinadas mutaciones. El doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* tiene un defecto de crecimiento en un medio sintético mínimo SD sin aminoácidos cuando se compara con un medio completo SC, mientras que ese hecho no se observa en los mutantes simples. Estas condiciones no son comparables a lo que ocurre en mosto, que si bien puede ser pobre en nitrógeno, contiene una mezcla completa de aminoácidos.

Pero sí indica que en el doble mutante hay un defecto en la respuesta a aminoácidos adicional a la provocada por la delección de la quinasa principal de GAAC, lo cual indicaría que Tsa1p pudiera tener algún papel en respuesta a nutrientes. Este defecto no es debido a una auxotrofia en concreto, porque no es suprimido por ninguno de los veinte aminoácidos proteicos, y parece reflejar un mecanismo de carácter general. Sin embargo el doble mutante sí tiene efecto sobre rutas específicas, ya que suprime parcialmente la sensibilidad a 3-aminotriazol (inhibidor de la síntesis de histidina) que presenta el mutante *gcn2Δ*, pero no a sulfometurón (inhibidor de la síntesis de leucina e isoleucina).

La otra ruta que controla la respuesta frente a ayuno de nitrógeno además de GAAC es la ruta TORC1. El complejo TORC1 se define por su sensibilidad a rapamicina. Sin embargo la delección de *TSA1* no produce una alteración en la sensibilidad a este compuesto. Aunque sí que presenta un fenotipo claro en aspectos controlados por TORC1. Por una parte el mutante *tsa1Δ* posee unos niveles de autofagia inducida por ayuno de nitrógeno reducida, cosa que no se observa en el mutante *gcn2Δ*. Este es un proceso regulado por TORC1, de manera que Tsa1p puede estar actuando en un punto intermedio entre los dos procesos. Otro aspecto regulado por TORC1 es la transcripción de genes sometidos a la represión por catabolito de nitrógeno (NCR). La expresión de tres de estos genes (*MEP2*, *GDH2* y *DAL5*) se estudió en varias condiciones experimentales. Se observó un patrón complejo de expresión, principalmente en el doble mutante, pero la delección de *TSA1* alteró la expresión de *GDH2* y *MEP2* en medio SC y menos en mosto. La expresión de estos genes está controlada por los factores de transcripción Gln3p y Gat1p, por medios que en principio parecen distintos a la activación de la autofagia, pero que parece que pueden ser afectados ambos por la acción de Tsa1p. El punto en común podría ser la actividad de fosfatasa antagónicas a TORC1. Se sabe que la fosfatasa PP2A desfosforila tanto a Gln3p como al regulador de la autofagia Atg13 (Tate et al., 2009; Yeasmin et al., 2016), una vez se inhibe TORC1 con rapamicina. Este u otro sistema *downstream* de TORC1 podría estar afectado por la acción de Tsa1p.

Otra diferencia entre las condiciones de envejecimiento en medio SC y la fermentación vínica es la participación del oxígeno y el tipo de metabolismo. Cuando se empieza a medir la viabilidad en un experimento en SC las levaduras han consumido la glucosa y el metabolismo es respiratorio. Sin embargo en una fermentación en mosto las células dejan de crecer cuando gran cantidad de azúcares y continúan fermentando activamente. El doble mutante *tsa1Δgcn2Δ* tiene un defecto grave en la asimilación del etanol y en el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y respirofermentativas, como la galactosa. Eso resultó estar ligado a un defecto en la represión por glucosa.

Este fenotipo justificaría la baja longevidad de las cepas vínicas portado ambas mutaciones en medio SC que es incapaz de obtener energía por respiración. Este hecho parece no tener relación con la respuesta retrógrada y la comunicación con la mitocondria, ya que el delecionar *GCN2* alivia parcialmente el defecto de longevidad del mutante de la respuesta retrógrada *RTG2* (ver Capítulo 1).

Sin embargo esta incapacidad de crecer en fuentes no fermentables del doble mutante no se observa en cepas de laboratorio e indica que la represión por catabolito presenta diferencias entre cepas de *S. cerevisiae* de diferente origen, un hecho que ya había sido descrito por otros autores con anterioridad, y que conviene tener en cuenta a la hora de estudiar la actividad de las rutas de respuesta a nutrientes en diferentes cepas, condiciones de crecimiento o propósitos biotecnológicos (Menesesetal.,2002).

CAPÍTULO 3: PAPEL DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA EN EL ENVEJECIMIENTO Y EN LA RESPUESTA A NUTRIENTES

Como se ha comentado en la introducción, la célula presenta dos mecanismos de acción principales frente a estrés oxidativo. Por un lado, hay un sistema de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Una serie de proteínas eliminan, de una manera u otra, estas especies reactivas que podrían causar un daño en las macromoléculas. Entre ellas, cabe destacar las superóxidos dismutasas, catalasas, y peroxidasas así como pequeñas moléculas antioxidantes, como el glutatión (GSH), el ascorbato o la vitamina E que tiene un papel de protección frente al estrés oxidativo. Por otro lado, se encuentra el sistema de reparación del daño oxidativo en el que intervienen dos sistemas principales, compuestos por un conjunto de proteínas que actúan en diferentes compartimentos celulares y que protegen a las proteínas del daño oxidativo, modulando así la actividad y regulación de dichas proteínas, éstos sistemas son el tiorredoxina (TRX) y el glutarredoxina (GRX). A lo largo de este capítulo y del capítulo siguiente se va a estudiar el papel del sistema tiorredoxina en la longevidad cronológica de levaduras vínicas en fermentación alcohólica y envejecimiento.

El sistema TRX citosólico está compuesto por las tiorredoxinas, que son pequeñas oxidorreductasas tiólicas que contienen dos residuos de cisteínas conservados (cys 32 y cys 35) en el sitio activo y participan en la reducción tiólica de las proteínas. El sistema resulta completado por la tiorredoxina reductasa, enzima de naturaleza flavoproteica que reduce la tiorredoxina oxidada para reactivar la forma tiólica, utilizando poder reductor en forma de NADPH. Tanto las tiorredoxinas, Trx1p, Trx2p (citosólicas) y Trx3p (mitocondrial), como las tiorredoxina reductasas Trr1p y Trr2p citosólica y mitocondrial respectivamente, juegan un papel muy importante en el metabolismo del peróxido de hidrógeno a través de las peroxirredoxinas, como se ha mencionado en el capítulo anterior (Toledano et al., 2007).

3.1 Respuesta a estrés oxidativo del mutante *trr1Δ* en cepas vínicas

3.1.1 Crecimiento en placa en presencia de peróxido de hidrógeno

Para analizar en detalle la tolerancia a estrés del mutante *trr1Δ* en el fondo genético de las cepas vínicas, se realizaron goteos de la cepa silvestre C9 y de su mutante en *TRR1* en placas de YPD con 2, 3 y 4 mM de H₂O₂, agente oxidante que activa mecanismos de regulación como los sistemas TRX y glutatión, y también la regulación de la ruta de las pentosas fosfato. Como se puede observar en la Figura 3.1, a 3 mM hay un pequeño crecimiento en *trr1Δ* que desaparece a concentraciones de 4mM, lo cual confirma la relevancia de esta proteína en la respuesta a estrés oxidativo en este fondo genético.

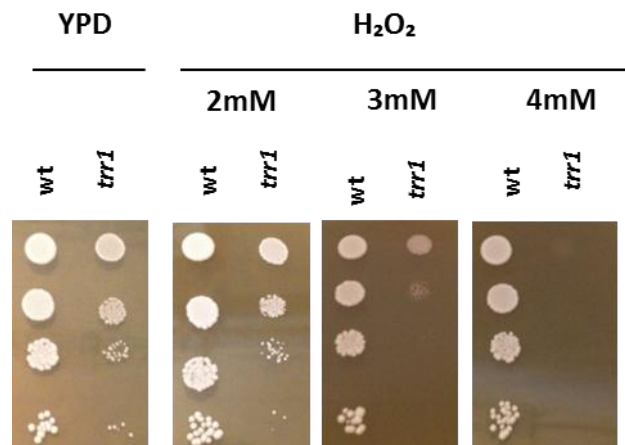


Figura 3.1 Crecimiento de la cepa *vínica* C9 y su mutante en la *tiorredoxina reductasa 1* en estrés oxidativo por H₂O₂. Goteos en placas de medio rico con diferentes concentraciones del oxidante H₂O₂, 2, 3 y 4 Mm.

Se ha descrito que, en los mutantes *trx1Δtrx2Δ* y *trr1Δ*, los niveles proteicos de la peroxirredoxina Tsa1p son altos, debido a la activación constitutiva del factor transcripcional Yap1p (Grant, 2008). En la Figura 3.2 se muestran los niveles de Tsa1p en el mutante *trr1Δ* en la cepa *vínica* C9 en presencia de estrés oxidativo por H₂O₂ 0,6 mM durante 15 y 30 minutos de crecimiento en medio líquido SC. Como se puede observar, el mutante de la *tiorredoxina reductasa* presenta un mayor nivel de proteína Tsa1p, pese a lo cual el mutante es sensible al oxidante (Figura 3.1), lo cual reafirma que Trr1p es la principal fuente de poder reductor para la reactivación funcional de Tsa1p.

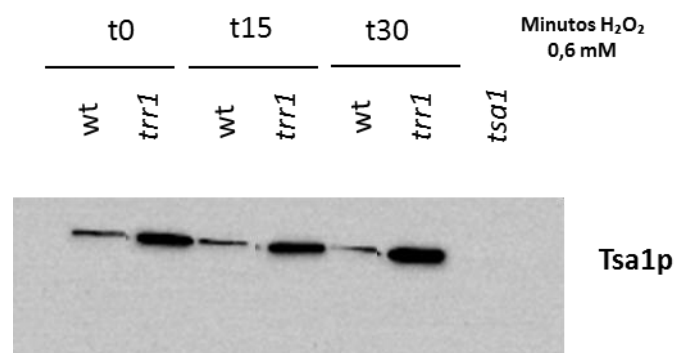


Figura 3.2 Niveles de la peroxirredoxina Tsa1p en el mutante *trr1Δ* en la cepa C9. Cuantificación mediante *western blot* de la proteína Tsa1p en el mutante *trr1Δ* en condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂.

3.1.2 Medida de las especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo

Se utilizó la cepa de laboratorio BQS252 para comparar dos fondos genéticos diferentes. Los ensayos de citometría de flujo se realizaron con esta cepa. Para determinar el impacto de la delección de *TRR1* en el estado redox celular se midió por citometría de flujo el porcentaje de células con especies reactivas del oxígeno, en la cepa mutante *trr1Δ* y la cepa silvestre en estado exponencial y en estado estacionario, tal como se describe en el apartado 5.2.3 de Materiales y Métodos.

En la Figura 3.3 se representa un diagrama de barras con los resultados obtenidos, mostrando el porcentaje de células con ROS en las dos cepas de estudio. Como se observa, el mutante *trr1Δ* en fase exponencial de crecimiento presenta menor porcentaje de células con ROS que la cepa silvestre, resultado sorprendente ya que la falta de actividad de la tiorredoxina reductasa 1 debería provocar una mayor cantidad de células oxidadas. La explicación de este fenotipo podría estar ligada al aumento de la cantidad de Tsa1p descrito en el apartado anterior (Figura 3.2), que debería obtener necesariamente su poder reductor de otra fuente. En estado estacionario la acumulación de ROS es mayor, de forma consistente con el metabolismo respiratorio característico de esta fase, y en estas condiciones, las diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *trr1Δ* no son significativas.

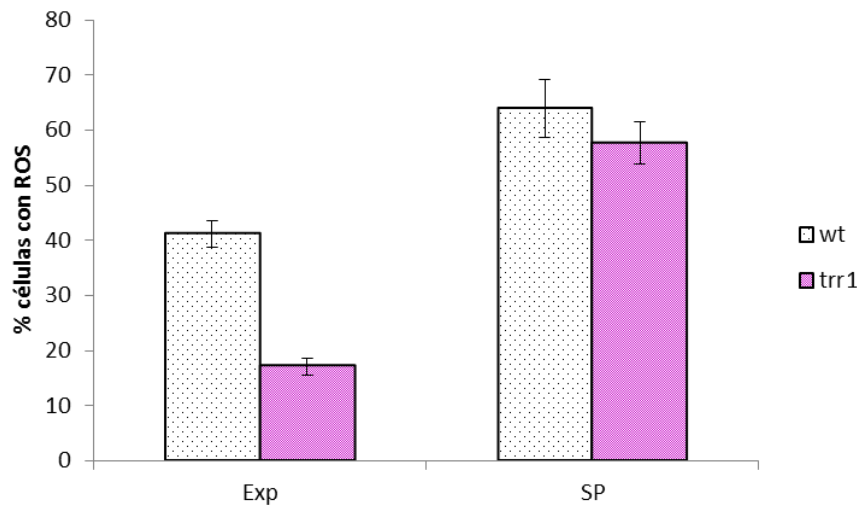


Figura 3.3 Medida de células con especies reactivas del oxígeno. Se midió mediante citometría de flujo la cantidad de células con especies reactivas de oxígeno (ROS) en estado de crecimiento exponencial (exp) y en estacionario (est) en la cepa silvestre (negro) y el mutante *trr1Δ* (morado) en la cepa de laboratorio BQS252. Se realizaron tres réplicas de cada uno de los experimentos y se muestran las medias y las desviaciones típicas.

3.1.3 Niveles de Glutación

El glutatión, como se ha comentado en la Introducción, es un tripéptido que actúa fundamentalmente como detoxificador de las especies reactivas del oxígeno. La homeostasis del glutatión es indispensable para la célula, ya que diversos factores que aumentan el nivel de estrés mediante la producción de ROS alteran la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG). Se ha mostrado el papel de glutatión como molécula protectora a través de la unión a los grupos tiol de las cisteínas, en una modificación postraduccional que se llama glutatiónilación. Se decidió estudiar el efecto de la delección de la tiorredoxina reductasa en los niveles de glutatión, tanto total como reducido y oxidado, así como los niveles de glutatión unido a la proteína. Se midió los niveles de glutatión en medio mínimo completo, en fases exponencial y estacionaria, en la cepa silvestre C9 y en el mutante en *TRR1* (Figura 3.4). Se ha descrito que los niveles de glutatión total son más elevados en fase exponencial en medio YPD, debido a que durante la fermentación de la glucosa, se produce un compuesto tóxico, metilglioxal, cuya detoxificación es dependiente de GSH, siendo necesario un aumento en los niveles de GSH total en estas condiciones (Aguilera and Prieto, 2004; Martins et al., 2001b). Como se puede observar en la Figura 3.4 A, en fase exponencial en medio SC, la cepa silvestre tiene una media de 18nmoles/mg célula de GSH total que disminuye a 10nmoles/mg célula en estado estacionario. Sin embargo, en el mutante en la *TRR1*, no ocurre lo mismo. En fase exponencial *trr1Δ* tiene unos niveles de GSH total de 7 nmol/mg célula mientras que en fase estacionaria, aumenta muchísimo los niveles (25 nmol/mg célula). Este aumento del GSH total en el mutante *trr1Δ* indica una deficiencia en la regulación de la homeostásis del GSH. En fase exponencial en SC, hay también más glutatión oxidado que en fase estacionaria en la cepa silvestre. Se estudió la relación GSH/GSSG siendo mayor en estado estacionario, debido en parte, a esos mayores niveles de glutatión total. En el caso del mutante *trr1Δ*, hay un gran aumento del GSSG en estado estacionario y aunque también aumenta la forma reducida GSH, la relación GSH/GSSG disminuye, lo que haría que las tiorredoxinas no dispongan del nivel de poder reductor necesario para realizar su ciclo catalítico y, como consecuencia, ciertas proteínas dependientes de ellas presentarían un defecto en su actividad en el mutante *trr1Δ*.

Los productos tóxicos de la fermentación de la glucosa y de la respiración tras el cambio diauxico no se eliminarían correctamente en el mutante *trr1Δ*, de manera, que en fase estacionaria, se acumularían desencadenando un aumento en el nivel de GSSG y, como se muestra en la Figura 3.4, un descenso de la relación GSH/GSSG. Estos resultados parecen sugerir un papel de Trr1p en la regulación de la síntesis de glutatión, mientras que los niveles de las dos formas de la molécula redox y su relación en el mutante *trr1Δ* no reflejan la eliminación de la función antioxidante, al menos en fase exponencial de crecimiento. Como se verá en el siguiente capítulo, los resultados obtenidos con el mutante *trr1Δ* no son coincidentes con los de la doble delección de los genes *TRX1* y *TRX2*, como cabría de esperar de su actividad tiorredoxina reductasa.

Debido al papel, anteriormente mencionado, de las tioredoxinas como deglutationiladoras y debido a que Trr1p es la donadora de poder reductor de estas proteínas, se estudió el efecto de la delección de *TRR1* en los niveles de glutatión unido a la proteína, que se muestra en la Figura 3.4B para la cepa silvestre y en el mutante *trr1Δ* en fase exponencial y estacionaria en medio SC.

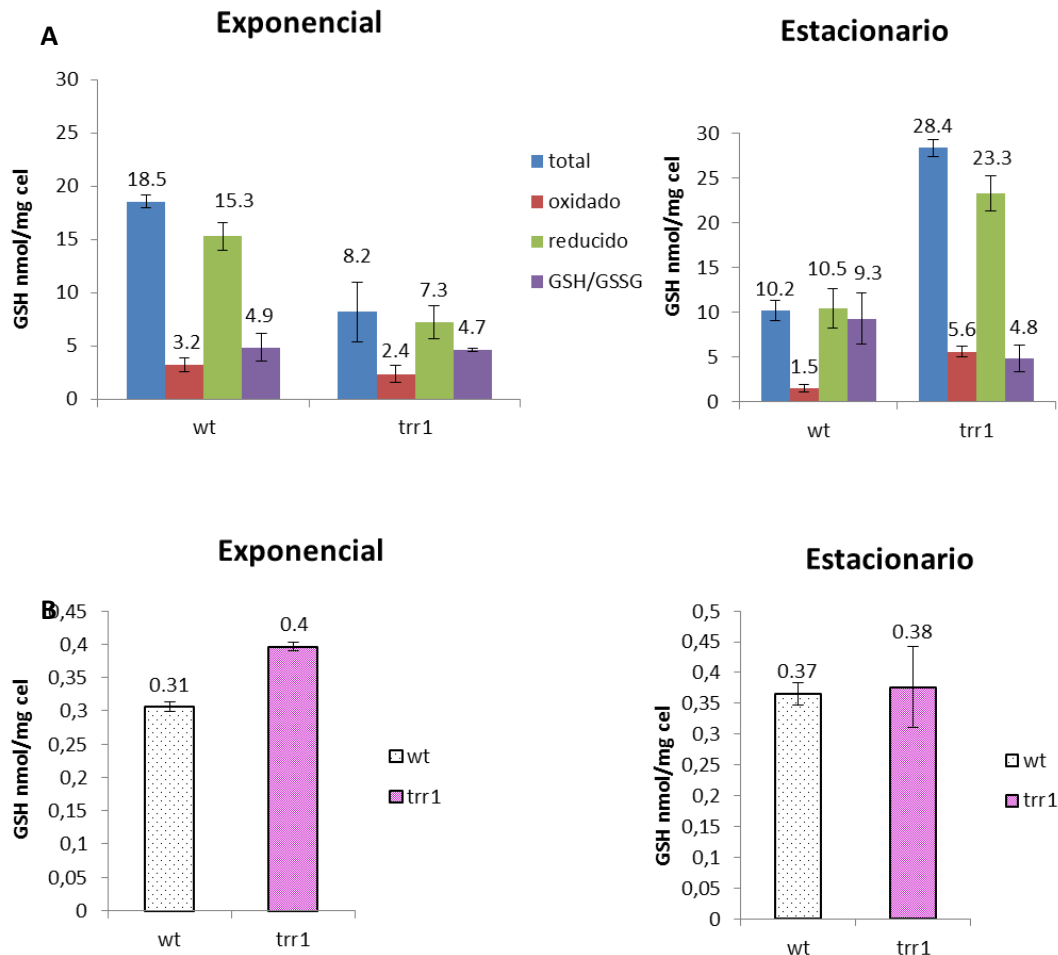


Figura 3.4 Indicadores de estado redox. Medida del glutatión total, glutatión oxidado y reducido y la relación entre glutatión reducido y oxidado en dos fases de crecimiento, exponencial y estacionaria, en medio mínimo completo SC en la cepa industrial C9. Se representan los nmoles de glutatión por mg de proteína **(A)**. Medida del glutatión unido a proteína en fase exponencial y estacionaria **(B)**. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Como se puede observar, en fase exponencial el mutante en *TRR1* presenta un mayor nivel de glutatión unido a proteína, lo que podría sugerir un defecto en la maquinaria de deglutationilación, supuestamente ligada a la menos actividad de las tioredoxinas citosólicas dependientes de Trr1p. En estos experimentos, no podemos afirmar si dichas proteínas glutationiladas se han formado *de novo* durante el crecimiento exponencial del cultivo o proceden de proteínas glutationiladas durante la fase estacionaria del precultivo anterior.

El nivel de glutationilación en la cepa silvestre apenas aumenta al entrar en fase estacionaria, lo cual sugiere que la glutationilación, en este fondo genético (C9) y/o en medio SC, no está ligada a fase estacionaria. En fase estacionaria no existen diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *trr1Δ*, indicando que los mecanismos de deglutationilación no están operativos en estas condiciones o no son estrictamente dependientes de Trr1p.

3.1.4 Niveles de actividad catalasa

Las catalasas son proteínas ubicuas con grupo hemo que catalizan la descomposición del H_2O_2 en agua y una molécula de oxígeno. En *S. cerevisiae* hay dos catalasas, codificadas por los genes *CTA1* y *CTT1*, la catalasa A (peroxisomal) y la catalasa T (citósólica) respectivamente. Las catalasas, junto con las glutatión peroxidadasas, son responsables de la eliminación del H_2O_2 formado en las células. Una mayor eficiencia catalítica es requerida para prevenir el daño oxidativo en crecimiento aeróbico. Por esta función, se midió la actividad catalasa total en la cepa silvestre y en el mutante de delección en *TRR1* en fase exponencial y fase estacionaria, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 3.5. Se observa que los niveles de catalasa en fase exponencial en SC en el mutante *trr1Δ* son 6 veces más altos que en la cepa silvestre. Este aumento de la actividad catalasa podría ser un mecanismo de compensación de la ausencia de *TRR1* y consiguiente disminución de la actividad de las tiorredoxinas en un crecimiento fermentativo y refleja una fuerte activación de la respuesta antioxidante en condiciones en las que normalmente no es requerida. En fase estacionaria, sin embargo, se observa el esperable aumento de la actividad catalasa en la cepa silvestre, al pasar a unas condiciones de mayor estrés oxidativo por activación del metabolismo respiratorio, pero no en mutante *trr1Δ* que mantiene el ya elevado nivel de la fase exponencial. Este resultado es consistente con datos previos de nuestro grupo que demuestran que una actividad basal elevada de actividades antioxidantes, en condiciones de bajo o nulo estrés oxidativo, puede prevenir su posterior inducción al someter a estrés intenso y resultar perjudicial para la supervivencia en esas condiciones (Gamero-sandemetrio et al., 2013; Gamero-Sandemetrio et al., 2014).

Debido al incremento en la actividad catalasa en el mutante *trr1Δ* en medio SC durante el crecimiento exponencial, se midió también su actividad catalasa en medio rico con 2% de glucosa, YPD, en fase exponencial, observándose que los niveles de catalasa aumentan más de 10 veces con respecto a los niveles de catalasa de la cepa silvestre (datos no mostrados). Así pues, este efecto es probablemente debido al estado metabólico en la fase exponencial de crecimiento en glucosa 2% y no a la riqueza del medio. Se ha descrito que en ausencia de *TRR1*, se produce la acumulación de Yap1p en el núcleo y la sobreexpresión de un grupo de oxidorreductasas reguladas por este factor transcripcional, y varias evidencias sugieren que son las tiorredoxinas oxidadas que se acumulan en el mutante *trr1Δ* las que actúan como activadoras clave de Yap1p (Ragu et al., 2014).

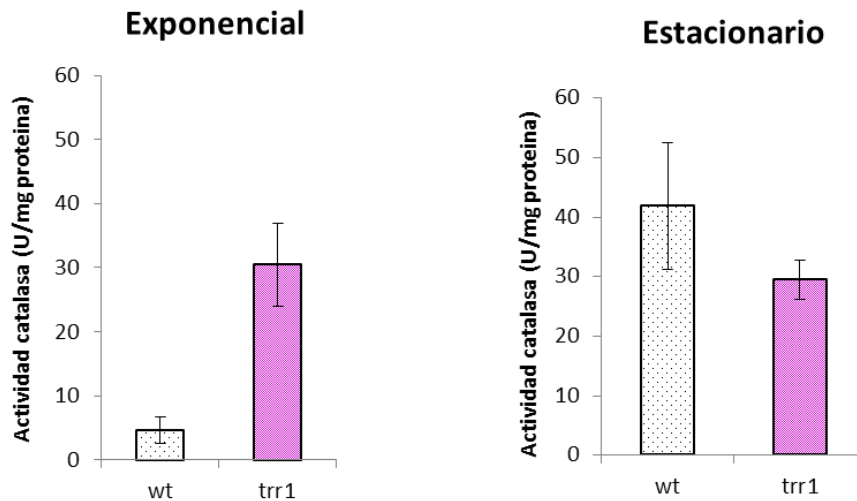


Figura 3.5 Medida de la actividad catalasa en el mutante *trr1Δ*. Se determinó la actividad catalasa total de la cepa silvestre y el mutante *trr1Δ* en fase exponencial y en fase estacionaria en medio mínimo completo SC. Se representa en unidades de actividad, U, por mg de proteína. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

3.2 Crecimiento y longevidad cronológica del mutante *trr1Δ* en cepas vínicas

Para estudiar el efecto de la delección de *TRR1* en crecimiento y LC se realizó un experimento en mosto natural, Figura 3.6 A, representado por unidades formadoras de colonias por mL a lo largo del tiempo de fermentación.

Para continuar con la caracterización del mutante en la tiorredoxina reductasa en la cepa vínica C9 se diseñaron experimentos de envejecimiento en medio mínimo completo SC y en vinificación en mosto natural, como los ya descritos a lo largo de los capítulos anteriores. La Figura 3.6 muestra los resultados de dichos experimentos, donde se observa que el mutante *trr1Δ* presenta un defecto en el crecimiento en mosto natural respecto de la cepa silvestre C9 (Panel A). Como se verá más adelante, en el Capítulo 4, el doble mutante en las tiorredoxinas tanto en mosto sintético como mosto natural (4.2 y 4.3) también presenta un menor crecimiento. Como se ha comentado en la Introducción, las tiorredoxinas regulan la reducción de la ribonucleótido reductasa, RNR, implicada en la síntesis de dNTPs. En ausencia de la tiorredoxina reductasa, las tiorredoxinas no tendrían fuente de poder reductor y no podrían reducir a la RNR que se encontraría totalmente oxidada y no podría sintetizar dNTPs, lo que podría contribuir, junto con otros muchos efectos, a dicho defecto en el crecimiento tanto del mutante simple *trr1Δ* como del doble *trx1Δtrx2Δ*.

Resultados y Discusión

En la Figura 3.6B se muestran las curvas de supervivencia en mosto natural. Como se puede observar, a pesar de alcanzar una menor densidad celular, el mutante *trr1* Δ presenta una supervivencia, o longevidad cronológica, similar a la cepa silvestre. En la Figura 3.6C se muestra el perfil de consumo de azúcares reductores a lo largo de la vinificación, donde se puede ver que no hay diferencias significativas entre el mutante *trr1* Δ y la cepa silvestre.

Dado que el mutante *trr1* Δ presenta una cinética normal de consumo de azúcares a pesar de alcanzar menor densidad celular que la cepa silvestre, se estudió también su capacidad fermentativa en medio YPGF, un medio rico con cantidad de azúcares fermentables similar a la del mosto natural, tal como se muestra en los apartados 2.2.1 y 5.1.4 de Materiales y Métodos, tanto al inicio como a las 24 h de crecimiento en este medio. Como se puede observar no hay diferencias entre la capacidad fermentativa del mutante *trr1* Δ y la de la cepa silvestre en las primeras 8 horas de crecimiento en YPGF (Panel D), sin embargo, el mutante *trr1* Δ tiene una mayor capacidad fermentativa que la cepa silvestre cuando se mide durante 8h a partir de las 24 h de crecimiento en medio YPGF (Panel E).

Respecto del envejecimiento en medio SC, el mutante *trr1* Δ presenta una menor longevidad cronológica que la cepa silvestre (Figura 3.6F) en estas condiciones de metabolismo predominantemente respiratorio, tras el cambio diaúxico que ocurre después de la fase exponencial de crecimiento predominantemente fermentativo. La acumulación de ROS durante la respiración del etanol y su defecto en la detoxificación podrían explicar la caída en la viabilidad del mutante *trr1* Δ en fase estacionaria en medio SC.

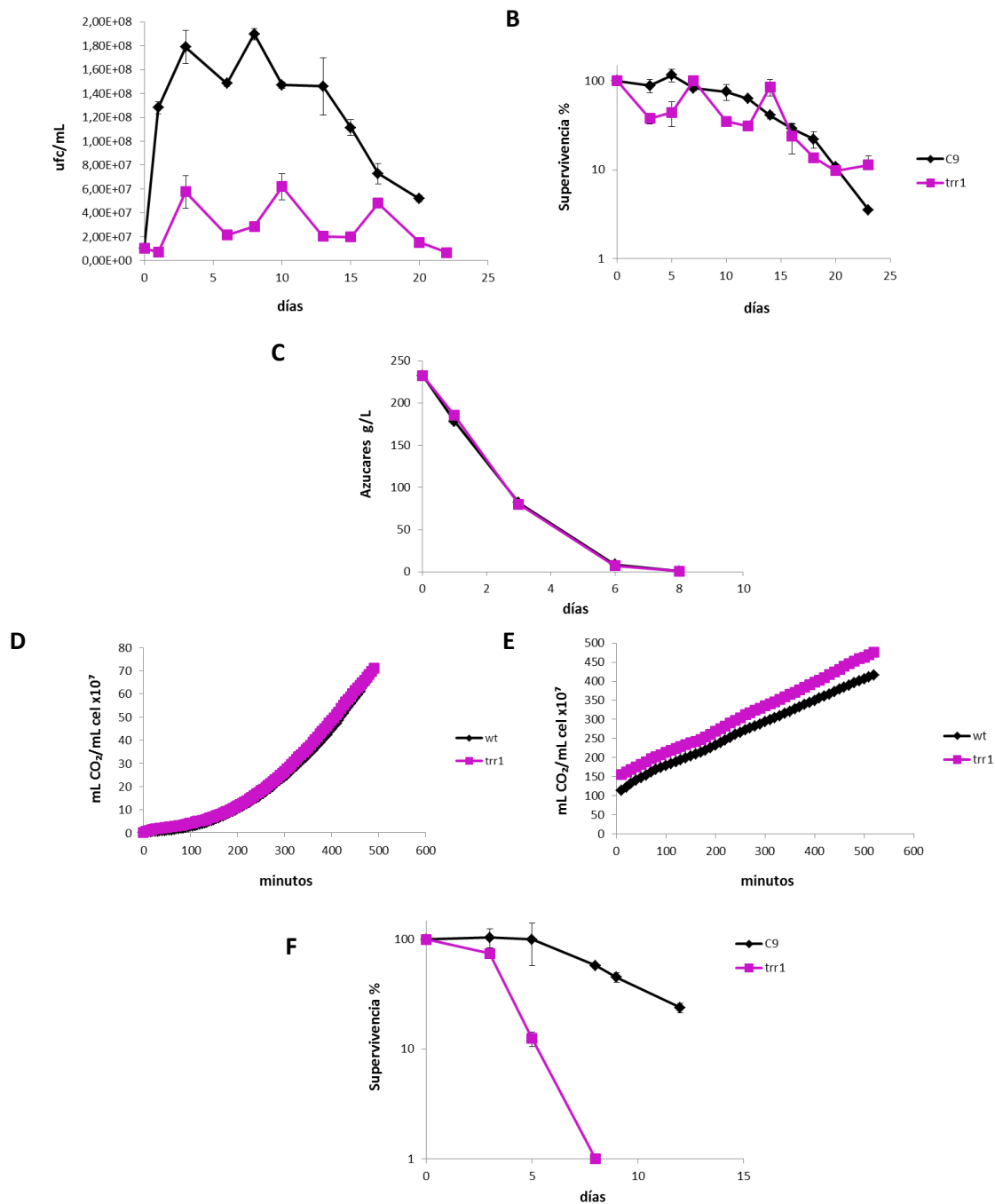


Figura 3.6 Comportamiento del mutante de la tiorredoxina reductasa 1 en fermentación en mosto natural y en envejecimiento en medio mínimo completo SC. Curva de crecimiento de la cepa silvestre C9 y del mutante *trr1Δ*, expresado en unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Curvas de supervivencia tomando el día 4 de crecimiento del panel A como 100% de viabilidad (B). Perfiles de consumo de azúcares reductores durante el proceso fermentativo, expresado en g/L (C). Capacidad fermentativa en las primeras 8 horas de crecimiento en medio YPGF medida en mL de CO₂ por ml y por número de células (D). Capacidad fermentativa medida durante 8 h a las 24 horas de crecimiento en el medio YPGF. Curva de supervivencia en medio mínimo completo (F). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

3.3 Interacción entre *TRR1* y *TOR1* y su papel en el envejecimiento cronológico

Existe una acumulación creciente de evidencias que ligan el estado redox celular con ciertos procesos regulados por nutrientes, como la autofagia, y se ha demostrado, que el uso de agentes oxidantes, como la diamida, activan este proceso, corroborando que cambios en el estado redox de los grupos tiol contribuye a su activación (Desideri et al., 2012). La autofagia, como se ha comentado en la Introducción y en los Capítulos 1 y 2, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular durante el ayuno de nutrientes y contribuye también a la eliminación de orgánulos dañados, proteínas mal plegadas y agregados proteicos. Defectos en la maquinaria autofágica pueden desembocar en diversas patologías en organismos superiores, así como en enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Levine et al., 2008). Scherz-shouval y colaboradores (2007), han demostrado que las ROS juegan un papel esencial en la autofagia inducida por el ayuno, papel mediado por Atg4p, una proteína implicada en los pasos iniciales de la formación del autofagosoma, que además tiene una actividad dependiente de estado redox (reducido activa, oxidado inactiva) y del sistema tiorredoxina, de manera que en un mutante *trx1Δtrx2Δ* presenta alteraciones de la autofagia (Desideri et al., 2012). Se ha demostrado que los altos niveles de glutatión intracelular podrían conducir la respuesta autofágica a varios niveles, y también el papel del glutatión en la regulación de la mitofagia en levaduras. Se ha visto (Desideri et al., 2012) que el tratamiento con rapamicina aumenta los niveles de glutatión total, altera el estado redox e induce la autofagia a través de los niveles de H₂O₂. Se demostró también que la glutatiónilación de proteínas contribuye sinérgicamente a la modulación de la autofagia por cambio en el estado redox celular hacia condiciones más oxidantes.

3.3.1 Crecimiento de los mutantes del sistema TRX en presencia de rapamicina

Debido al posible papel que juega el estrés oxidativo en la autofagia, a través de TORC1, se decidió realizar un estudio del crecimiento de mutantes en las diferentes proteínas del sistema tiorredoxina en la cepa C9 en presencia de rapamicina. Se deletaron los genes *TRX1* y *TRX2* en la cepa haploide industrial C9 tanto individual como conjuntamente para obtener los mutantes simples y el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. A continuación se realizaron goteos en placas de YPD con 100nM de rapamicina, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 3.7 A. En contra de lo esperable a partir de datos bibliográficos sobre los mutantes en las tiorredoxinas 1 y 2 y su relación con la autofagia a través de Atg4p, el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en la cepa C9 no presenta un crecimiento diferente a los de la cepa silvestre y de los mutantes simples *trx1Δ* y *trx2Δ* en presencia de rapamicina. Sin embargo, el mutante *trr1Δ* presenta un defecto claro de crecimiento. Una vez más, el fenotipo del mutante *trr1Δ* difiere del fenotipo del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, lo que sugiere que Trr1p tiene otras funciones, todavía desconocidas, independientes de la regulación del sistema tiorredoxina.

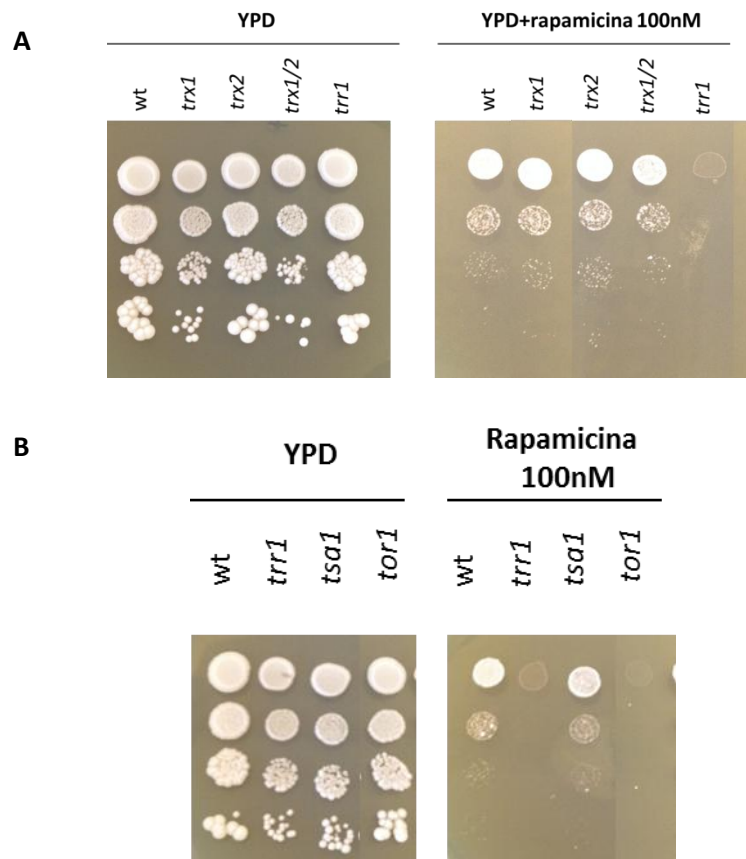


Figura 3.7 Respuesta de crecimiento de mutantes del sistema TRX a la inhibición de *TOR1* con rapamicina. Goteos en placa de YPD y de YPD con rapamicina 100nM de la cepa C9 y de mutantes en genes del sistema TRX y en *TOR1*.

Se decidió repetir los goteos, esta vez utilizando como control negativo el mutante de delección en *TOR1*, y también el mutante de la peroxirredoxina citosólica Tsa1p, que requiere del poder reductor de Trr1p. En la Figura 3.7 B se recogen los resultados de los nuevos goteos. El mutante en *TSA1*, como los de las tiorredoxinas, no es sensible a rapamicina, pero si lo es el mutante *trr1* Δ , reincidiendo en que este es un efecto específico de Trr1p. Como se puede observar, el mutante en *TRR1* se comporta igual que el mutante en *TOR1*. Debido a este fenotipo, se estudió la relación entre *TOR1* y *TRR1*, con el fin de investigar las posibles conexiones genéticas que expliquen el defecto de crecimiento del mutante *trr1* Δ en presencia de rapamicina.

3.3.2 Crecimiento de los mutantes del sistema TRX y en *TOR1* en presencia del agente reductor DTT

Se realizaron goteos en placas de YPD con DTT 1mM, como agente reductor, en placas con rapamicina 100nM y en placas con rapamicina y DTT 1mM, para dilucidar si el fenotipo de sensibilidad a rapamicina del mutante *trr1Δ* puede ser suprimido con un agente reductor que corrija el exceso de estrés oxidativo. En este experimento se utilizó tanto la cepa industrial como la cepa de laboratorio para ver si el defecto observado es común en diferentes fondos genéticos. Como se observa en la Figura 3.8, en placas en presencia del reductor DTT 1Mm no hay diferencias en el crecimiento respecto de lo observado en YPD, tanto en los mutantes construidos en la cepa industrial C9 como en cepa de laboratorio, lo que permiten concluir que los fenotipos observados son independientemente del fondo genético.

En placas con rapamicina 100Nm, el mutante *tor1Δ* y el mutante *trr1Δ* en la cepa industrial y en la de laboratorio tienen un defecto en el crecimiento. En presencia simultánea de DTT y rapamicina, los mutantes *trr1Δ* no presentan reversión de su fenotipo de crecimiento deficiente en presencia de rapamicina, lo que permite concluir la existencia de una interacción física y/o genética entre *TRR1* y *TOR1*, como se ha observado en experimentos anteriores, y no debida a estrés oxidativo interno que, de manera indirecta, podría causar ese fenotipo.

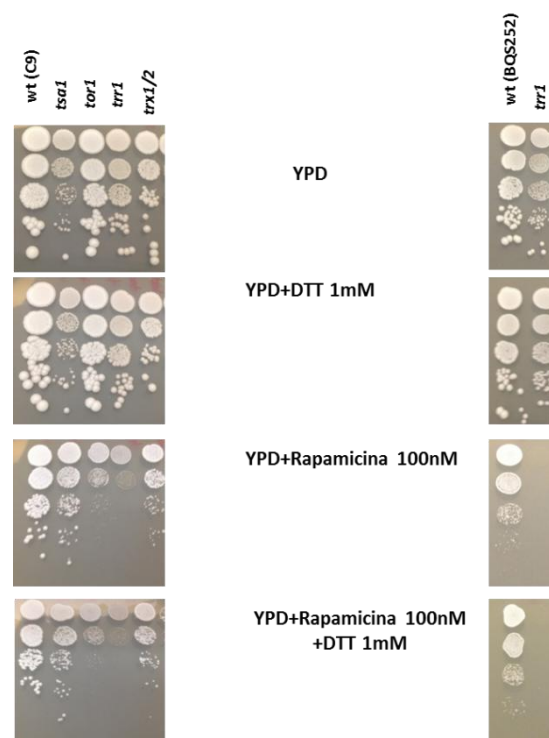


Figura 3.8 Crecimiento en presencia del inhibidor de *TOR1*, rapamicina, y de un reductor, DTT. Goteos en placas de YPD, de YPD con Rapamicina 100nM, de YPD con DTT 1 mM, así como de YPD con la combinación de ambos compuestos, de mutantes del sistema TXR y en *TOR1* en la cepa vónica industrial C9 y en cepa de laboratorio.

3.3.3 Medida de ROS en el mutante *trr1Δ* en presencia de rapamicina

Para descartar que el efecto observado en el mutante *trr1Δ* en presencia de rapamicina se deba a una consecuencia indirecta del aumento del estrés oxidativo en esta cepa, no corregible por la adición de DTT en el medio de cultivo, se midió la acumulación de ROS por citometría de flujo en la cepa de laboratorio, tal y como se hizo en el Apartado 3.2.3 (Figura 3.3). Como se observa en la Figura 3.9, no hay un aumento de ROS en presencia de rapamicina 100mM, ni la cepa silvestre ni en el mutante *trr1Δ*, todo lo contrario, los niveles de ROS son incluso menores que en la cepa silvestre. Esto confirma que la inactivación de TORC1 no genera un aumento intracelular de ROS y que, por tanto, el defecto de crecimiento del mutante *trr1Δ* en presencia de rapamicina no se debe a un efecto indirecto causado un mayor estrés oxidativo.

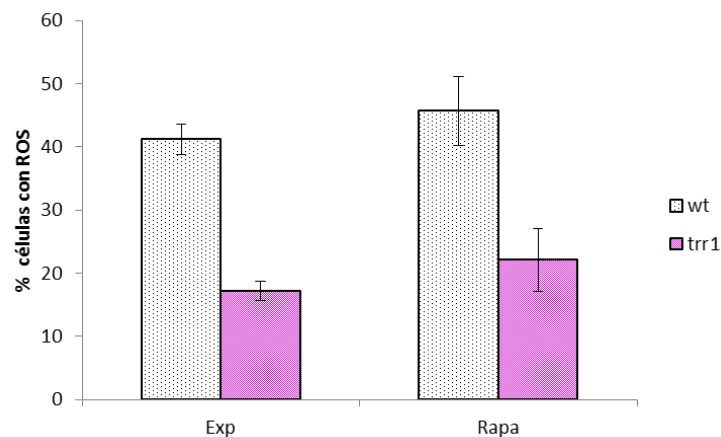


Figura 3.9 Medida de células con especies reactivas del oxígeno en presencia y ausencia de rapamicina en la cepa silvestre C9 y en el mutante *trr1Δ*. Se midió, mediante citometría de flujo, la cantidad de células con especies reactivas de oxígeno en estado de crecimiento exponencial (exp) y en presencia de rapamicina (rapa) en la cepa silvestre (negro) y el mutante *trr1Δ* (morado). Se realizaron tres réplicas de cada uno de los experimentos y se muestran las medias y las desviaciones típicas.

3.3.4 Influencia de la conexión *TOR1-TRR1* en el crecimiento y en la longevidad

Para ahondar en el estudio de la conexión entre la ruta TORC1 y *TRR1* se analizó la potencial interacción genética y su influencia en el crecimiento y en el envejecimiento en mosto sintético (para comparar crecimiento en dos mostos diferentes, natural, Figura 3.6 A y sintético) y en medio mínimo completo SC sin y con limitación de nitrógeno. En la Figura 3.10 se muestra los resultados de los experimentos de vinificación en mosto sintético de los mutantes simples en *TRR1* y *TOR1* así como el doble mutante *trr1Δtor1Δ* en la cepa industrial haploide C9.

Resultados y Discusión

En el panel A, se muestra el crecimiento a lo largo del proceso fermentativo, donde se puede observar que el mutante *trr1* Δ presenta un crecimiento similar al de la cepa silvestre en los primeros momentos, para después presenta recuentos inferiores al igual que ocurría en mosto natural (Figura 3.10A). El mutante *tor1* Δ tiene un mayor crecimiento en mosto sintético y el doble mutante *trr1* Δ *tor1* Δ presenta un pico temprano de crecimiento con el número máximo de unidades formadoras de colonia más que el resto de las cepas, pero que cae muy rápidamente en los primeros días de crecimiento. En el panel B, se muestran las curvas de supervivencia en estado estacionario, utilizando el día 3 de crecimiento de panel A como 100% de viabilidad. Como se observa, el mutante *trr1* Δ presenta una longevidad cronológica menor que la cepa silvestre, el mutante *tor1* Δ tiene una longevidad cronológica similar a la cepa silvestre y el doble mutante *trr1* Δ *tor1* Δ presenta la menor longevidad cronológica, inferior tanto a la de la cepa silvestre como a la de los dos mutantes simples. El patrón de interacción genética es complejo, ya que la doble mutación promueve un mayor crecimiento celular máximo, superior al provocado por la mutación *tor1* Δ , y también un envejecimiento muy rápido, más que el provocado por la mutación *trr1* Δ .

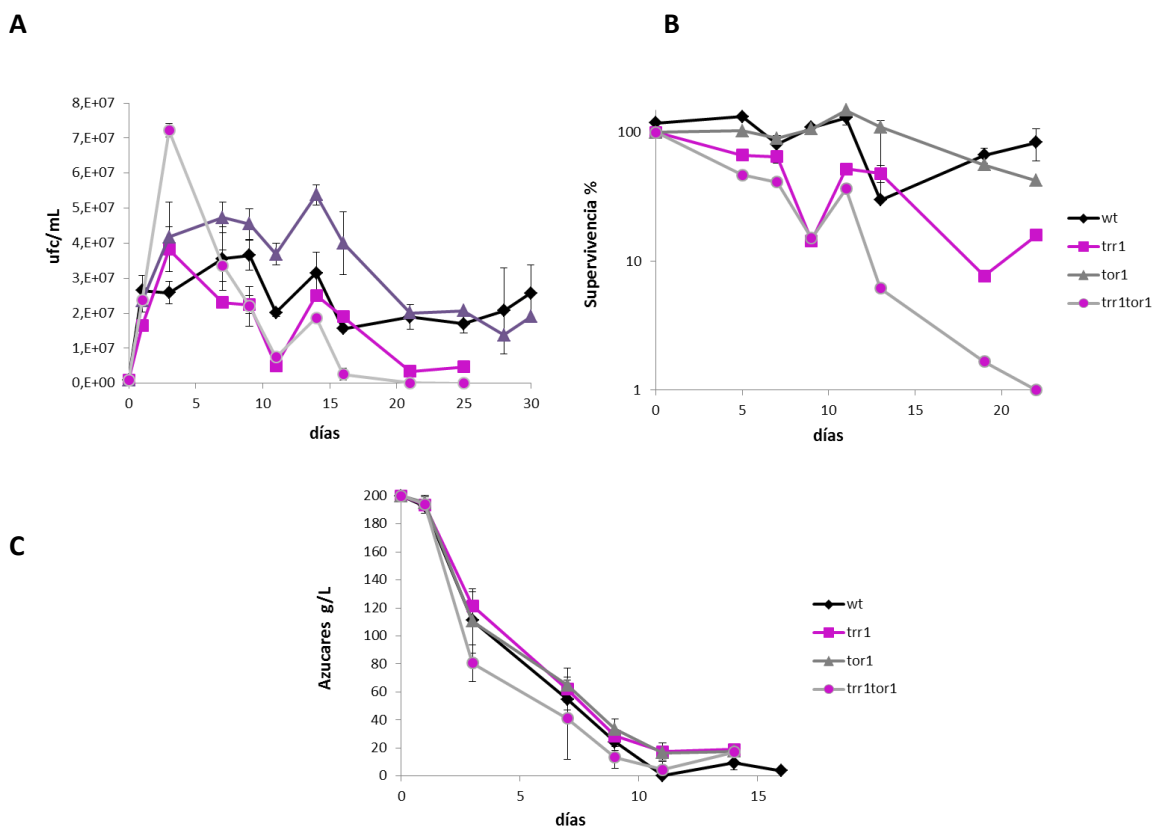


Figura 3.10 Conexión entre *TRR1* y *TOR1* en fermentación en mosto sintético. Crecimiento de los mutantes *trr1* Δ , *tor1* Δ y doble *trr1* Δ *tor1* Δ en mosto sintético. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL a lo largo del proceso fermentativo (A). Curvas de supervivencia en mosto sintético tomando el día 4 del panel A como 100% de viabilidad (B). Consumo de los azúcares reductores a lo largo de la fermentación (C). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

El seguimiento de las vinificaciones mediante las cinéticas de consumo de azúcares reductores (Panel C) muestra que el doble mutante *trr1Δtor1Δ* los consume más rápidamente en los primeros días, lo que podría explicar el rápido y alto crecimiento al principio, aunque posteriormente se ralentiza y se retrasa, posiblemente como consecuencia de su rápida pérdida de viabilidad. El resto de cepas no presentan diferencias significativas en el consumo de los azúcares reductores. Se realizó ensayos de envejecimiento con y con 1/25 de nitrógeno para estudiar la influencia de la disponibilidad de nitrógeno en la conexión entre *TRR1* y *TOR1*. Los resultados se representan en la Figura 3.11. En el Panel A, se muestra la curva de envejecimiento en condiciones estándar en medio SC tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad. Al igual que se observaba en los experimentos del Capítulo 1, Figura 1.7B, el mutante *tor1Δ* presenta una ligera extensión de longevidad cronológica y el mutante *trr1Δ*, una disminución de longevidad cronológica, respecto de la cepa silvestre. El doble mutante *trr1Δtor1Δ* presenta un fenotipo de envejecimiento en SC más errático, en ocasiones intermedio entre la cepa silvestre y el mutante *trr1Δ*, aunque más cercano a este último y siempre con menos supervivencia que la cepa silvestre. En la figura B se muestran las curvas de supervivencia en medio mínimo completo SC con 1/25 de fuentes de nitrógeno asimilables, para causar un ayuno de nitrógeno sin inducir malnutrición, donde el 100% de viabilidad corresponde al día 7 de crecimiento. Como se puede observar, el mutante *tor1Δ* presenta una longevidad ligeramente inferior, lo que sugiere que el cambio en la proporción carbono/nitrógeno en el medio altera la LC de este mutante como ya se observó en los experimentos descritos en el Capítulo 1 en el caso de la delección del gen *SCH9*. En estas condiciones, el mutante *trr1Δ* y el doble mutante *trr1Δtor1Δ* acortan su longevidad drásticamente de forma similar.

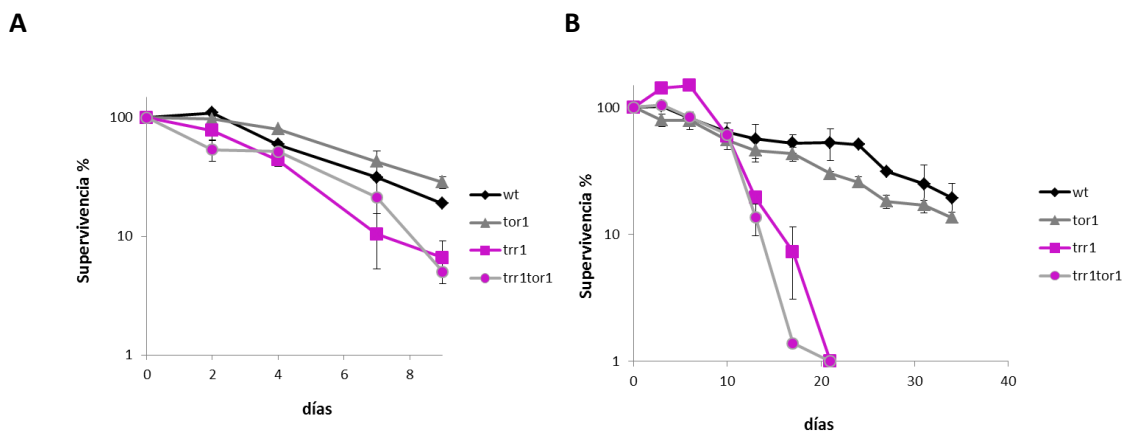


Figura 3.11 Conexión entre *TRR1* y *TOR1* en experimentos de envejecimiento. Curvas de supervivencia de la cepa silvestre C9 y de los mutantes simples *trr1Δ* y *tor1Δ* y doble *trr1Δ tor1Δ* en medio mínimo completo SC (A). Curvas de supervivencia en medio mínimo completo SC con 1/25 de nitrógeno asimilable (B). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

El análisis conjunto de los dos experimentos de envejecimiento en medio SC sin y con limitación de nitrógeno permite concluir que el efecto de la mutación *trr1Δ* es más acusado y predominante, especialmente en SC 1/25, sugiriendo que la función de Trr1p tiene mayor impacto para la longevidad cronológica en estas condiciones de cultivo, fundamentalmente respiratorias, que la de *TOR1*, lo que resulta coherente en el crecimiento en un medio con limitación de nitrógeno, donde la actividad de TORC1 cesa rápidamente. Por lo que tanto en mosto sintético (Figura 3.10) como en mosto natural (Figura 3.6) *trr1Δ* tiene un menor número de colonias por mL, es decir, tiene un menor crecimiento que la cepa silvestre. Este menor crecimiento no se traduce en una caída drástica de la LC ni en un defecto en el consumo de los azúcares. Por lo que, en condiciones predominantemente fermentativas *trr1Δ* tiene un defecto de crecimiento que podría estar justificado por un defecto en condiciones de ayuno de nitrógeno. La tiorredoxina reductasa es la que proporciona poder reductor en forma de NADPH a las tiorredoxinas citosólicas para que éstas modulen la actividad de ciertas proteínas como la actividad de la ribonucleótido reductasa (RNR). La deficiencia de crecimiento del mutante *trr1Δ* podría explicarse por la deficiencia en la producción de dNTPs y división celular. El mutante *tor1Δ* tiene un crecimiento mayor que la cepa silvestre y su LC excepto en algunos puntos, es similar al de la cepa silvestre. *TOR1* es necesario para la división celular y el crecimiento. En ausencia de *TOR1* se activan mecanismos de supervivencia celular como la autofagia. En condiciones de vinificación no hay diferencias importantes en el mutante *tor1Δ*. En cuanto al doble mutante *trr1Δtor1Δ* tiene una LC inferior al resto de cepas indicando que en condiciones de ayuno de nitrógeno la ausencia de *TOR1* junto con *TRR1* dificulta la capacidad de respuesta a este estrés y hace que su viabilidad se reduzca.

En medio SC donde hay un metabolismo respiratorio importante al final de la fermentación de los azúcares el comportamiento de las cepas es diferente. Por un lado, *trr1Δ* tiene una LC reducida que podría ser debido a la acumulación de ROS durante la fase de respiración que, aunque los niveles de Tsa1p son altos y no hay una mayor cantidad de ROS en el mutante *trr1Δ*, no es suficiente para extender la LC. Este defecto en la LC en el mutante *trr1Δ* es mucho más extenso en condiciones de ayuno de nitrógeno por lo que también está implicada la respuesta a nutrientes. En cuanto al mutante *tor1Δ* tiene una pequeña extensión de la LC en medio SC mientras que en condiciones de ayuno de nitrógeno esto no ocurre. El doble mutante se comporta de manera similar al *trr1Δ*.

3.3.5 Respuesta a la inhibición de la síntesis de aminoácidos

Para continuar con el estudio de la conexión entre la ruta *TORC1* y Trr1p, se analizó el crecimiento de la cepa silvestre C9 y de los mutantes simples *tsa1Δ*, *tor1Δ*, *trr1Δ* y *sch9Δ* y dobles de *trr1Δ* con *tor1Δ*, *sch9Δ* y *tsa1Δ*, en presencia de compuestos que provocan ayuno intracelular de nitrógeno mediante goteo en placas de medio mínimo SD con dichos compuestos. El uso del medio SD en estos experimentos es necesario para poder observar deficiencias de crecimiento ocasionadas por ayuno intracelular de aminoácidos.

El objetivo de estos experimentos es analizar el efecto de la mutación *trr1Δ*, sola y combinada con las otras, en función del compuesto presente en el medio para poder extraer información de la relevancia de la función de Trr1p y de sus conexiones con las rutas de respuesta a estrés oxidativo y a la limitación de nitrógeno en las que están implicadas las demás mutaciones analizadas. En la Figura 3.12 A se muestran los resultados de los goteos realizados.

En primer lugar se utilizó sulfoximin L-metionina (MSX), un inhibidor de la enzima glutamina sintetasa que provoca restricción dietaria intracelular de glutamina y, esta, una inactivación parcial de *TORC1* (Crespo et al., 2002). En presencia de MSX se observa que el mutante en *TRR1* es más sensible que el resto de las cepas y es incapaz de crecer. La ausencia de fenotipo claro del mutante *TOR1* indica que probablemente *TOR2* es capaz de suplir su ausencia para dar suficiente cantidad del complejo TORC1. Se observa defecto de crecimiento del resto de mutantes simples y también de la cepa silvestre, pero únicamente el mutante *trr1Δ* presenta defecto completo de crecimiento. Si observamos los dobles mutantes, el efecto de la mutación en *TRR1* no se revierte con las mutaciones adicionales de *tor1Δ*, *sch9Δ* y *tsa1Δ*, y los dobles mutantes combinados muestran prácticamente nulo crecimiento como el mutante simple *trr1Δ*. El MSX es un compuesto, como se ha comentado a través de la inactivación parcial de *TOR1* mediante el ayuno de glutamina (fuente de nitrógeno preferente de la levadura), activa la transcripción de tres factores de transcripción, Gln3p, Rtg1p y Rtg3p. Por lo que, el defecto de crecimiento del mutante *trr1Δ* podría ser por el defecto en la actividad del complejo multidominio TORC1/C2. Se utilizó también 3AT, 3-amino-1, 2,4-triazol, un inhibidor competitivo de la imidazol glicerol fosfato deshidratasa codificada por el gen *HIS3*, que inhibe la síntesis de histidina provocando un ayuno intracelular de este aminoácido y activando la ruta GAAC. En los goteos en medio SD con 3AT 10Mm no hay diferencias significativas en el crecimiento en presencia de ayuno de histidina en los mutantes simples ni en los mutantes dobles aunque los mutantes combinados con la delección de *TOR1* y *SCH9* tienen un defecto de crecimiento no muy acusado. Es decir, el mutante *trr1Δ* tiene un defecto en MSX que es un compuesto que actúa vía TOR1 mientras que otros inhibidores de la síntesis de aminoácidos como el 3AT actúan a nivel del factor de transcripción Gcn4p corroborando que *TRR1* tiene una conexión en la respuesta a la disponibilidad de nutrientes vía *TOR1*.

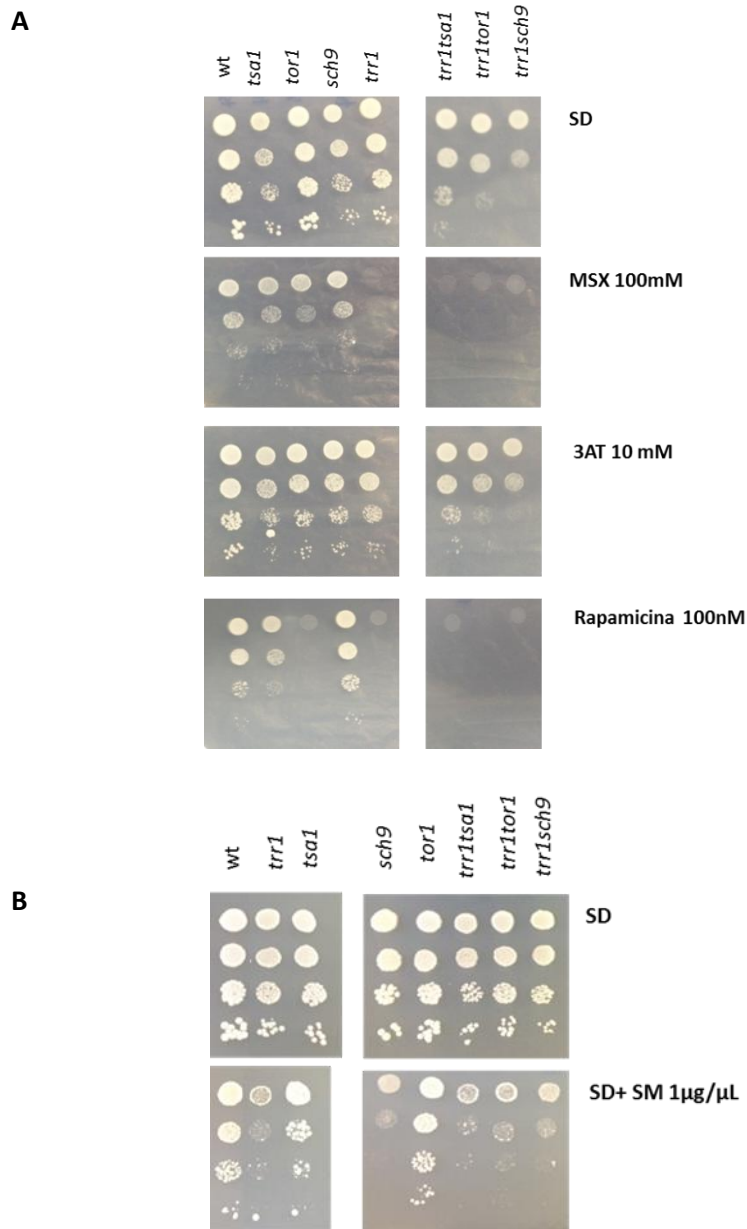


Figura 3.12 Respuesta al ayuno de nitrógeno. Crecimiento de los mutantes simples *tsa1*Δ, *tor1*Δ, *sch9*Δ y *trr1*Δ así como de los dobles mutantes *trr1*Δ*tsa1*Δ, *trr1*Δ*tor1*Δ y *trr1*Δ*sch9*Δ en goteos en placa medio mínimo SD con el L-metionina-S-sulfoximina (MSX) 100mM, 2,4-triazol (3AT) 10mM y rapamicina 100nM **(A)** y con sulfometurón metil (SM) 1µg/µL **(B)**.

Se realizaron goteos en medio SD con rapamicina 100nM. Se repite el mismo fenotipo que se observa a lo largo de todo el capítulo, el mutante *trr1*Δ y por lo tanto los mutantes dobles de *tsa1*Δ, *tor1*Δ, *sch9*Δ tienen defecto de crecimiento en rapamicina. Para ampliar el espectro de compuestos inhibidores de rutas biosintéticas específicas, se probó otro compuesto, el sulfometurón metil, SM, un potente inhibidor de la acetolactato sintetasa y, por tanto, de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina), Figura 3.12 B.

Se ha descrito que la exposición de levaduras a SM disminuye el crecimiento en un 40%, activándose genes de biosíntesis de aminoácidos y cofactores, y reprimiéndose enzimas glicolíticas y proteínas ribosomales, efectos equivalentes a los causados por la inhibición de la ruta TORC1 (Jia et al., 2000). Como se observa en la Figura 3.13, no hay diferencias muy importantes. *trr1Δ* presenta un menor crecimiento en presencia del compuesto SM y excepto *tor1Δ*, todos los mutantes combinados con la mutación *trr1Δ* presentan un defecto en el crecimiento. Se vuelve a corroborar que *TRR1* está conectado con *TOR1* y que en condiciones de ayuno de nitrógeno por glutamina y por los aminoácidos de cadena ramificada (todos a través de la ruta TORC1) el mutante *trr1Δ* tiene un defecto de crecimiento de manera que, el defecto de crecimiento mayor en el mutante *trr1Δ* podría indicar que *TRR1* tiene un papel regulando la estabilidad del complejo multidominio TORC1/C2.

El análisis conjunto de los ensayos de crecimiento de los mutantes en presencia de compuestos que producen diferentes efectos en la disponibilidad de nitrógeno muestra, por primera vez, que la tiorredoxina reductasa no sólo tiene un papel importante en la célula en condiciones de ayuno de nitrógeno, sino que ese papel es selectivo y diferencial según la alteración metabólica y las consecuencias señalizadoras específicas del ayuno de nitrógeno. Así, Trr1p juega un papel en condiciones de ayuno de glutamina y de aminoácidos ramificados, provocados por el MSX y el SM, respectivamente, y que operan a través de la ruta TOR, mientras que no parece estar implicada en condiciones de ayuno de histidina, provocado por 3-AT, que opera a través del GAAC.

3.3.6 Crecimiento en presencia de cafeína

La cafeína ha sido descrita como un inhibidor de *TORC1* con efectos, en *S. cerevisiae* y en otros organismos, en procesos celulares relacionados con el crecimiento, morfología, integridad celular y ciclo celular, reparación y recombinación del DNA, homeostasis del calcio y también respuesta a estrés oxidativo (Fabre, 1972; Sutton et al., 1991; Costigan et al., 1992; Castillo et al., 2003; Reinke et al., 2006). En la levadura *S. pombe* se ha visto que la actividad tiorredoxina reductasa controla la actividad del factor transcripcional Pap1p, ortólogo de Yap1p de *S. cerevisiae*, a través de su estado de oxidación y que los mutantes en esa actividad son resistentes a cafeína debido a la oxidación constitutiva de Pap1p y su localización nuclear que activa transportadores ABC que incrementan la resistencia a la cafeína (Calvo et al., 2009). Por ello, se estudió la tolerancia a diferentes concentraciones de cafeína de los diferentes mutantes en estudio mediante experimentos de goteo en placa, cuyos resultados se muestran en la Figura 3.13. En placas de YPD con 4 mM de cafeína no hay diferencias significativas en el crecimiento de los diferentes mutantes, creciendo, incluso, el mutante en *tor1Δ*, aunque se ha descrito que la cafeína inhibe parcialmente a *TORC1*. A concentración 10mM de cafeína se observa ya un defecto de crecimiento en todos los mutantes, siendo más acusados los de los mutante *tor1Δ* y *sch9Δ*. También crecen peor los mutantes simple *tsa1Δ* (menos afectado) y *trr1Δ*, y los dobles mutantes combinados de *trr1Δ* con *sch9Δ*, *tsa1Δ* y *tor1Δ*, por lo que no se observa el fenotipo de mayor resistencia a la cafeína descrito para el mutante *trr1Δ* en *S. pombe*.

Sin embargo, resulta interesante que en todos los goteos en presencia de cafeína, y muy claramente en 10 mM, se observa un mejor crecimiento del doble mutante *tsa1Δtrr1Δ*, mejor que el del mutante simple *trr1Δ*, a partir de lo cual habría que concluir que, en ausencia de tiorredoxina reductasa, la ausencia de la peroxirredoxina Tsa1p mejora la resistencia a cafeína. En los goteos en presencia de 20 mM de cafeína, donde apenas hay crecimiento del resto de cepas, aún se observa un cierto crecimiento del doble mutante *tsa1Δtrr1Δ*. Aunque no es posible dar una explicación molecular precisa a este comportamiento, cabe la posibilidad de que la ausencia de mecanismos de recuperación de la forma reducida, funcional, de Tsa1p haga celularmente más ventajoso no disponer de la peroxirredoxina Tsa1p que tener que gestionar la acumulación de formas oxidadas, irreversibles funcionalmente, de la misma. Esta hipótesis cuenta con algunas evidencias de apoyo en este trabajo, como, por ejemplo, en este mismo experimento, el hecho de que el mutante simple *tsa1Δ* sea menos sensible a cafeína que el mutante *trr1Δ*, o los datos de longevidad cronológica de los mutantes puntuales de la peroxirredoxina Tsa1p en envejecimientos en medio SC, que dan una menor LC de los mutantes puntuales en solo una de las Cys del sitio activo que los mutantes de delección de *TSA1* (Figura 2.25).

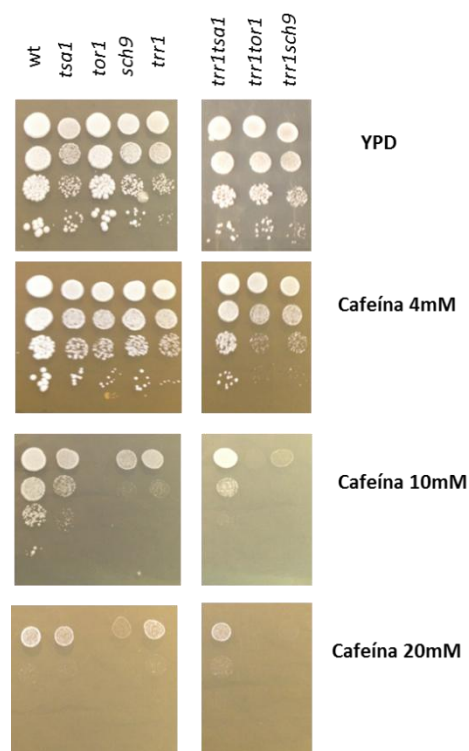


Figura 3.13 Crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de cafeína. Goteos en placas de YPD e YPD con concentraciones de cafeína, 4, 10 y 20 Mm, de los mutantes *tsa1Δ*, *tor1Δ*, *sch9Δ*, *trr1Δ* y los dobles mutantes *trr1Δtsa1Δ*, *trr1Δtor1Δ* y *trr1Δsch9Δ*.

3.3.7 Autofagia

La activación de la autofagia es un consecuencia funcionalmente muy importante de la carencia de nutrientes. Como ya se ha mostrado en el capítulo anterior, es posible usar una proteína quimérica de fusión Pgk1p-GFP como marcador de la macroautofagia inducida por ayuno de nitrógeno. En la Figura 3.15 A se observa un análisis de este tipo en la cepa silvestre C9 y en la cepa mutante *trr1Δ* a los 4 días de cultivo en un medio sin nitrógeno, tiempo que, en estudios anteriores del laboratorio, ha mostrado ser suficiente para inducir la autofagia. Como se puede observar en el Panel A, el mutante *trr1Δ* tiene un claro defecto en la autofagia, cuantificada en solo el 37% en comparación con la cepa silvestre, que tiene un 50%. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los experimentos de crecimiento por goteo en placas con rapamicina, en los que el mutante *trr1Δ* tiene un defecto de crecimiento similar al mutante *tor1Δ* (Figura 3.7, 3.9 y 3.12).

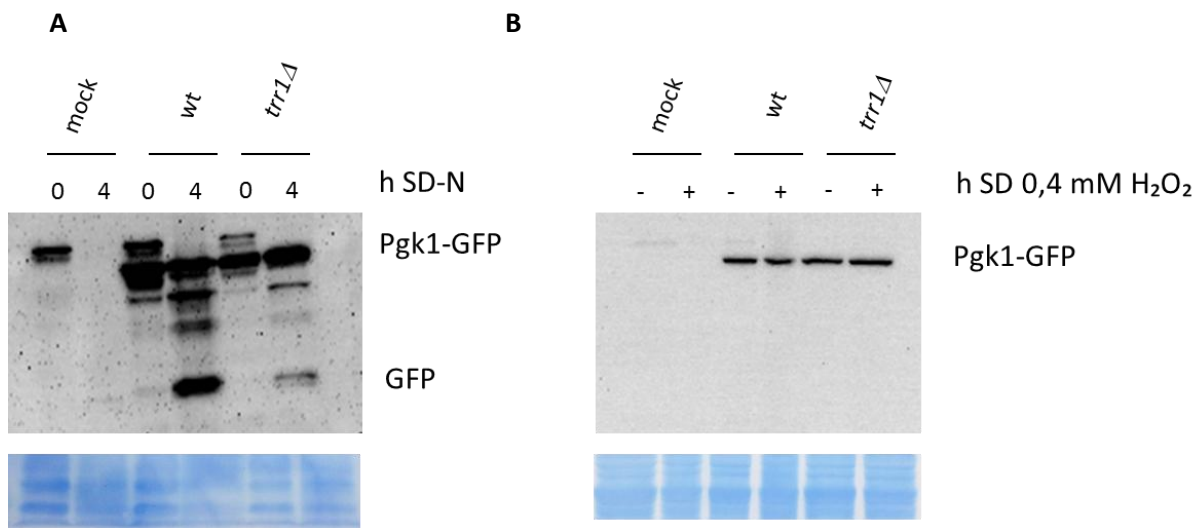


Figura 3.15 Papel de la tiorredoxina reductasa en autofagia en condiciones de ayuno de nitrógeno. Western blot de la proteína de fusión PGK1-GFP, como marcador de autofagia, en condiciones de ayuno de nitrógeno en la cepa silvestre y en el mutante de la tiorredoxina reductasa (A). Western blot de la autofagia de la construcción PGK1-GFP en condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂ 0,4 mM durante 4 horas (B). Se utilizó como control la cepa silvestre C9 sin la etiqueta (mock).

Estudios previos han descrito el papel de las tiorredoxinas citosólicas en la regulación de la autofagia a través de la regulación redox de Atg4p, proteína importante para la formación del autofagosoma. El doble mutante *trx1Δtrx2Δ* tiene una mayor inducción de la autofagia en presencia de rapamicina. Se decidió estudiar el efecto en la autofagia, usando este mismo marcador Pgk1p-GFP, en las condiciones descritas en esos estudios, de estrés oxidativo con H₂O₂ a 0,4mM durante 4 horas. Como se puede observar en la Figura 3.15 B, no se observa autofagia de Pgk1p-GFP en condiciones de estrés oxidativo, ni en la cepa silvestre ni en el mutante *trr1Δ*, de manera que en estas condiciones, en nuestras cepas, el peróxido de hidrógeno no es capaz de desencadenar una respuesta autofágica.

El conjunto de resultados descritos ratifican que el defecto de crecimiento del mutante *trr1Δ* en presencia de rapamicina no se debe a un estrés oxidativo interno debido a la ausencia de actividad tiorredoxina reductasa, sino que se debe a una interacción genética y/o física entre *TRR1* y algún componente de la ruta TORC1.

3.3.8 Fosforilación de Rps6p

Dado a que el mutante *trr1Δ* presenta un fenotipo de crecimiento similar al del mutante *tor1Δ* en presencia de rapamicina, se decidió estudiar otra de las dianas de la actividad de TORC1, la proteína ribosomal Rps6p en dos cepas de levadura, una industrial y una de laboratorio, y en el mutante *trr1Δ* en ambos fondos genéticos.

La fosforilación de Rps6p es sensible a nutrientes, hormonas, factor de crecimiento y una variedad de estrés (Meyuhas, 2008) y está conservada desde levaduras a mamíferos. En eucariotas superiores, hay 5 sitios de fosforilación en su extremo carboxilo terminal, de los cuales dos, las serina 235 y 236 en eucariotas superiores, están conservados en levadura (S232/S233). En levadura, no está claro si la fosforilación es a través de Sch9p, o podría ocurrir a través de Ypk1, 2,3p (Yerlikaya et al., 2015). En todo caso, la fosforilación de Rps6p indica el estado activo de TOR. Por ello, se estudió la fosforilación de Rps6p en las siguientes condiciones: fase exponencial de crecimiento en medio mínimo SD, fase exponencial de crecimiento en medio SD sin nitrógeno, fase exponencial de crecimiento en medio SD con rapamicina y fase estacionaria de crecimiento en SD (24 h) en las cepas silvestres vínica y de laboratorio, y en sus mutantes en *TRR1*. La detección se realizó mediante *western blot* con un anticuerpo específico para la fosforilación en los residuos de serina conservados, 232 y 233, según se describe en los apartados 4.1.1 y 4.4.3 de Materiales y Métodos. Como control, se utilizó la proteína constitutiva Pgk1p, tal y como se muestra en la Figura 3.16.

A partir de los niveles de fosforilación de Rps6p, la inactivación de TORC1 se observa claramente en fase estacionaria y a tiempos largos en ayuno de nitrógeno en ambas cepas, siendo parcial cuando se utiliza rapamicina en tiempos de crecimiento más cortos. En ambas cepas silvestres, se produce una defosforilación de Rps6p de condiciones de crecimiento exponencial a tratamiento con rapamicina (en C9 se defosforila un 97% y en BQS252 un 99%) Como podemos observar no hay diferencias de un fondo genético a otro. En el mutante *trr1Δ* en presencia de rapamicina, la fosforilación de las serinas 232 y 233 aumenta respecto de la cepa silvestre en las mismas condiciones, lo que indica que la actividad *TORC1* es mayor, es decir, que la delección de *TRR1* reduce la inhibición de TOR por rapamicina, es decir en el mutante *trr1Δ* en la cepa C9 hay un defecto en la defosforilación, sólo se defosforila un 67%, y en el mutante *trr1Δ* de la cepa de laboratorio un 20%.

En condiciones de ayuno de nitrógeno (SD-N) hay una defosforilación de Rps6 ya que la ruta *TOR1* está inactiva. Este fenotipo es común tanto en las cepas industriales como en las de

laboratorio así como en la cepa silvestre y la cepa mutante *trr1Δ* y también ocurre lo mismo en fase estacionaria (esta).

La diferencia principal en el mutante *trr1Δ* respecto de la cepa silvestre es que los niveles de fosforilación de Rps6p en presencia de rapamicina se mantienen próximos a los detectados en su ausencia (exp), lo que significa que *TOR1* no resulta inactivado. El mutante *trr1Δ* no es capaz de crecer en placas con 100 nM de rapamicina y estos experimentos demuestran que la inactivación de TORC1 por rapamicina no se produce, lo cual podría producir el defecto de crecimiento ya que si *TOR1* sigue activo aun en presencia de rapamicina en el mutante *trr1Δ* no se activarían los procesos de respuesta a la inhibición de *TOR1* (como la autofagia, Figura 3.15) y esto provocaría un defecto en el crecimiento.

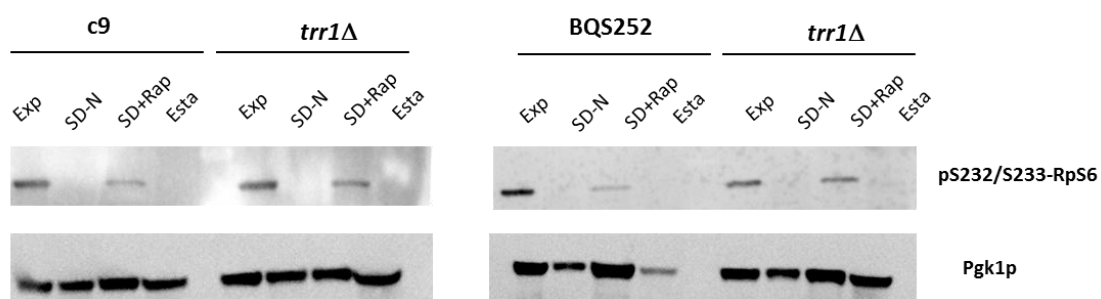


Figura 3.16 Fosforilación de Rps6p como medida de la actividad de *TOR1* en el mutante *trr1Δ*. *Western blot* para la detección de la fosforilación Rps6p utilizando un anticuerpo específico de la fosforilación de los residuos S232 y S233. En el panel inferior se muestra, como control de carga, la detección de la proteína constitutiva Pgk1p con un anticuerpo específico.

3.4 Interacción entre *GTR1-TRR1*

Con el fin de identificar nuevos mecanismos que ligen Trr1p con la actividad de TORC1 se buscaron evidencias en la literatura que dieran pistas sobre este posible vínculo. En un experimento de *pull-down* con una versión etiquetada con TAP de la GTPasa Gtr1p se indentificó a Trr1p como parte de un complejo mayor (Bonfils et al., 2012). Como se ha mencionado en la Introducción, Gtr1p es una subunidad del complejo GTPasa de TORC1, donde forma un complejo con Gtr2p para el correcto funcionamiento de TORC1. La localización del complejo es vacuolar, requerido para la función de Gap1p y para la microautofagia y se requiere para la localización del complejo TORC1 en la membrana de la vacuola (Kira et al., 2016). Además, se ha escrito como implicado en el transporte de fosfato y silenciamiento telomérico (Bonfils et al., 2012).

3.4.1. Interacción entre *TRR1* y *GTR1* y su impacto en la longevidad cronológica

Para analizar esta interacción *in vivo*, se construyeron el mutante de delección en *GTR1* y el doble mutante entre *TRR1* y *GTR1* en la cepa industrial C9 y se realizó un ensayo de envejecimiento cronológico en medio SC de los mutantes simples y doble. En la Figura 3.17 se representan las curvas de supervivencia tras 3 días de crecimiento en este medio. Como se puede observar, el doble mutante *trr1Δgtr1Δ* presenta una reducida longevidad cronológica, muriendo a día 5 de envejecimiento. El mutante simple *trr1Δ* tiene una longevidad cronológica corta comparado con la cepa silvestre pero más larga que el doble mutante. El mutante simple *gtr1Δ* tiene una longevidad similar a la de la cepa silvestre. El fenotipo del doble mutante indica que hay una conexión genética entre *TRR1* y *GTR1*, que provoca un efecto aditivo respecto al envejecimiento, por ello se decidió estudiar la respuesta de estos mutantes a la rapamicina.

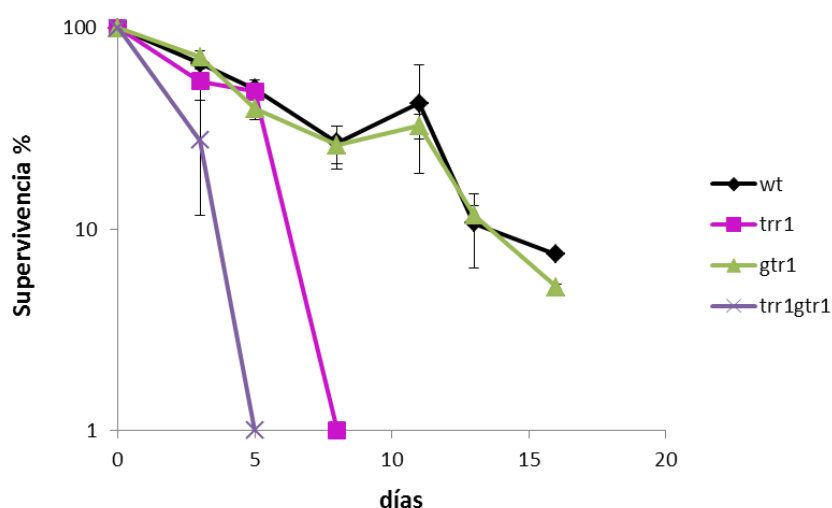


Figura 3.17 Conexión entre *TRR1* y *GTR1* en envejecimiento cronológico. Curvas de supervivencia de la cepa silvestre C9 y de los mutantes *trr1Δ*, *gtr1Δ* y *trr1Δ gtr1Δ* en condiciones de envejecimiento tomando el día 3 de crecimiento como 100% de viabilidad. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

3.4.2 Interacción entre *TRR1* y *GTR1* y crecimiento en rapamicina

En la Figura 3.18 A se muestra el crecimiento en medio YPD con rapamicina en placa, donde se observa un defecto de crecimiento tanto en el mutante *trr1Δ* como en el mutante *gtr1Δ*, completamente incapaz de crecer, así como el doble mutante *trr1Δgtr1Δ*, lo que impide detectar ningún efecto aditivo o sinérgico adicionales. Por ello, se realizaron cultivos en medio líquido en YPD sin y con rapamicina que permitieran detectar diferencias más sutiles, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 3.18B.

La gráfica superior del panel B corresponde al crecimiento en medio YPD líquido, donde se observa que los mutantes simples no presentan diferencias con respecto a la cepa silvestre, mientras que el doble mutante *trr1Δgtr1Δ* tiene un claro defecto de crecimiento en medio rico YPD.

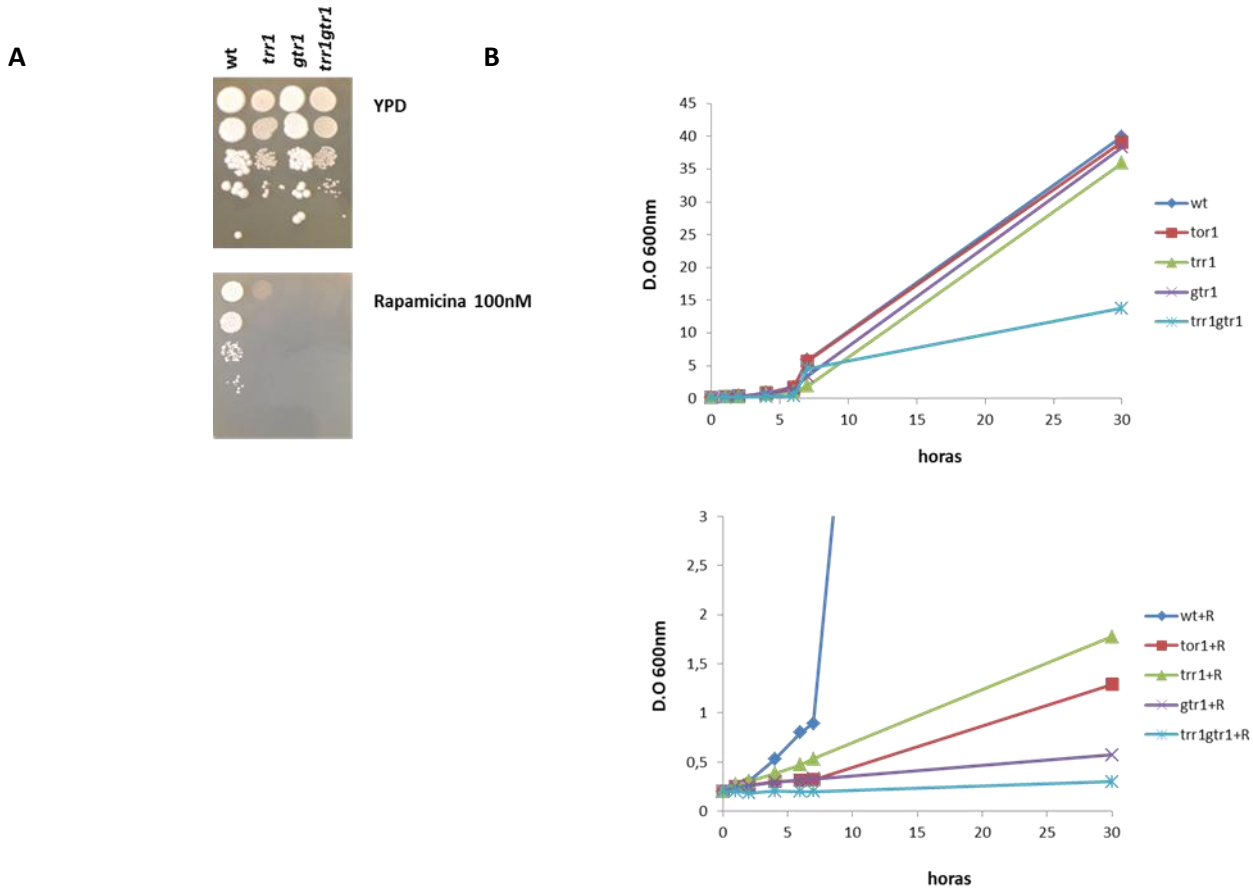


Figura 3.18 Conexión entre *TRR1* y *GTR1* y crecimiento en presencia de rapamicina. Crecimiento e la cepa silvestre C9 y de los mutantes simples, *trr1Δ* y *gtr1Δ* y doble *trr1Δgtr1Δ*, en placas de YPD en presencia de 100nM de rapamicina (**A**) y crecimiento en medio YPD líquido, medido en D.O_{600nm} a lo largo de 30 h, *tor1Δ* sin (**B superior**) y con rapamicina (**B inferior**).

Si observamos el crecimiento en presencia de rapamicina 100nM, en la parte inferior el Panel B, se observa un defecto de crecimiento en todos los mutantes en comparación con la cepa silvestre. El mutante *gtr1Δ* es más sensible a rapamicina que el mutante *tor1Δ*, mientras que el mutante *trr1Δ* lo es menos. El doble mutante es prácticamente incapaz de dividirse ya que apenas hay cambio de densidad óptica a lo largo de 30 h de cultivo en YPD con rapamicina. Estos resultados indican la existencia de una conexión entre *TRR1* y *GTR1* que hace que los defectos de crecimiento de ambas mutaciones, aditivos, se agraven en presencia de rapamicina.

Como resumen de los resultados obtenidos en las diferentes aproximaciones desarrolladas en este capítulo con el objetivo de investigar la conexión de la tiorredoxina reductasa citosólica 1, Trr1p, con las rutas de respuesta a estrés oxidativo y de señalización de nutrientes se puede concluir que, efectivamente, Trr1p es relevante para la tolerancia a estrés, ya que su delección causa un aumento de la sensibilidad a peróxido de hidrógeno (Figura 3.2) y, consiguientemente, disminuye la longevidad cronológica en condiciones de metabolismo respiratorio. Sin embargo otros aspectos no correlacionan con el efecto esperado de un mutante implicado en la eliminación de daño oxidativo. Por ejemplo, la acumulación intracelular de ROS en el mutante *trr1Δ* es menor durante el crecimiento exponencial, lo que podría explicarse por la activación de sistemas alternativos eficientes. La actividad catalasa y la cantidad de la peroxirredoxina Tsa1p aumentan tanto en fase exponencial como estacionaria en dicho mutante, al igual que los niveles totales de glutatión.

Como se ha observado, a pesar de que en condiciones de fermentación en mosto, donde el metabolismo es plenamente fermentativo, el mutante *trr1Δ* alcanza una menor densidad celular (Figura 3.1 A), esto no se traduce en un defecto en su LC en este medio, que es similar a la cepa silvestre (Figura 3.1 B). Sin embargo la LC del mutante en medio SC es mucho menor que en la cepa silvestre (Figura 3.1 F) de lo que se puede concluir que las células sin Trr1p no tienen la protección necesaria para hacer frente a las ROS producidas durante el metabolismo respiratorio. Se ha descrito que la disminución en la LC depende de los niveles de NADPH en el medio, observando una relación directa entre bajos niveles de NADPH, mayor estrés oxidativo, y menor LC, que no ocurriría en condiciones de restricción calórica en la que los niveles de NADPH aumentan extendiendo así la LC (Brandes et al., 2013). Ya que el NADPH es un sustrato de Trr1p, se puede deducir que los niveles de NADPH no colapsan durante la fermentación como ocurre durante el envejecimiento en medios donde el metabolismo es respiratorio.

En este capítulo, además, se describe una posible nueva función de la tiorredoxina reductasa 1 mediante su conexión con las rutas de respuesta a nutrientes. Se observó un defecto del mutante *trr1Δ* en su capacidad de crecer en presencia de rapamicina, inhibidor de TORC1. Este defecto en el crecimiento en *trr1Δ* es similar al del mutante *tor1Δ* (Figura 3.7). Además se utilizó una cepa de laboratorio para comprobar que este defecto en *trr1Δ* era independiente del fondo genético (Figura 3.9). Para demostrar que este fenotipo no se debía a una consecuencia indirecta del aumento del estrés oxidativo en el mutante *trr1Δ*, se midió el nivel intracelular de ROS en presencia de rapamicina, observándose que no se ve afectado (Figura 3.8). Mediante la construcción del doble mutante de delección entre *TRR1* y *TOR1*, se observó que el efecto de la mutación *trr1Δ* es dominante respecto del fenotipo de longevidad cronológica (Figuras 3.10 y 3.11). Además, hay un defecto en la autofagia en el mutante *trr1Δ* en condiciones de ayuno de nitrógeno, así como un defecto en la defosforilación de la proteína ribosomal Rps6p en presencia de rapamicina (Figuras 3.15 y 3.16 respectivamente) indicando, una vez más, el papel de Trr1p en la regulación de los procesos controlados por TORC1.

Finalmente, se observó que la interacción entre *TRR1* y *TOR1* podría ocurrir a través de la proteína perteneciente al complejo TORC1, Gtr1p, que interacciona físicamente con ella. El doble mutante de los genes *GTR1* y *TRR1* presenta una LC muy reducida en comparación con los mutantes simples, corroborando esta interacción (Figura 3.17). Además, en experimentos en presencia de rapamicina, el doble mutante *trr1Δgtr1Δ* es incapaz de crecer (Figura 3.18). De manera que Trr1p podría estar regulando el crecimiento y las respuestas a rapamicina y autofágica a través de la GTPasa de TORC1, Gtr1p.

Sin embargo no hay indicios del mecanismo que pueda estar implicado. Queda aún otra potencial diana de control redox por Trr1p. Se ha descrito que *TOR* tiene una característica estructura multidominio, en la que sólo el dominio quinasa tiene función catalítica, mientras que los otros dominios median la interacción del complejo con sus sustratos y reguladores (Dames et al., 2005). Se ha detectado una estructura conservada del dominio carboxilo terminal de las dos quinasas Tor1p y Tor2p, denominado FATC. Se ha demostrado que este dominio en su forma oxidada tiene una estructura α -hélice y forma un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas conservados. Los estudios de este dominio indican que el potencial redox intracelular, podría estar afectando al complejo *TORC1* y por lo tanto regulándolo, a través de este dominio FATC. En base a nuestros resultados con el mutante *trr1Δ* y sus conexiones y a esta hipótesis de regulación del complejo multidominio *TORC1* a través del potencial redox intracelular mediante la formación de un puente disulfuro intramolecular en Tor1p para su correcto funcionamiento, se puede especular que Trr1p medie la regulación redox de este dominio, afectando a la estabilidad y función del complejo, y por tanto a la sensibilidad a rapamicina de Tor1p y a la actividad de la ruta TOR.

CAPITULO 4. ESTUDIO GLOBAL DEL SISTEMA TIORREDOXINA Y DE SUS IMPLICACIONES EN LONGEVIDAD CRONOLÓGICA

Como ya se ha mencionado en la Introducción, las células de los organismos aeróbicos están expuestas a las especies reactivas del oxígeno, que afecta a la homeostasis redox celular. Las ROS pueden dañar macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y DNA, afectando el correcto funcionamiento celular. Se ha descrito que estas alteraciones del balance redox están asociadas a enfermedades neurodegenerativas, ya que es un factor importante en la regulación del crecimiento celular, senescencia y envejecimiento. Harman, en 1956, propuso por primera vez que los productos derivados de la respiración celular estaban implicados en el envejecimiento y en numerosas enfermedades y se formuló la teoría de envejecimiento por radicales libres. La teoría postulaba que el envejecimiento estaba causado por reacciones irreversibles de estos radicales libres sobre macromoléculas y que esto ocurría en organismos aeróbicos siendo la mitocondria la mayor fuente de ROS.

Se ha visto una correlación entre un aumento de los radicales libres del oxígeno y una menor longevidad replicativa y la aparición de marcadores apoptóticos (Abdel-Ghany et al., 2008; Ayer et al., 2014; Grant, 2008), pero también diversos estudios han demostrado que un incremento en la respiración mitocondrial, que promueve la producción de ROS, permite la adquisición de resistencia al estrés y con ella una adaptación y una extensión de la longevidad (Cunningham et al., 2015; Ristow and Schmeisser, 2011). En estudios anteriores de nuestro laboratorio se ha descrito la importancia de la respuesta al estrés oxidativo en el ámbito biotecnológico de las levaduras vínicas, en concreto, en la producción de levadura seca activa, tanto en el crecimiento como la deshidratación, así como en los procesos fermentativos conducidos por cepas de *S. cerevisiae* o por levaduras de otras especies y géneros (Garre et al., 2010; Gómez-Pastor et al., 2012a; Gamero-Sandemetrio et al., 2014)

Como ya se ha comentado repetidamente, para hacer frente a estos radicales libres, así como para eliminar el daño producido, las células, tienen sistemas de protección frente al estrés así como de detoxificación. Juegan un papel muy importante, como se ha mencionado en la Introducción y a lo largo de toda la tesis, especialmente en el Capítulo 3, el sistema tiorredoxina (TRX) que está compuesto por tres tiorredoxinas, dos de ellas citosólicas, Trx1p y Trx2p, una mitocondrial, Trx3p, así como de dos tiorredoxina reductasas que dan el poder reductor a las tiorredoxinas en forma de NADPH, Trr1p y Trr2p, citosólica y mitocondrial respectivamente. Tras el análisis de las conexiones de la tiorredoxina reductasa Trr1p con diferentes mecanismos reguladores relacionados con la longevidad cronológicas de las levaduras vínicas, descrito en el capítulo anterior, nos centramos ahora en las tiorredoxinas citoplasmáticas, Trx1p y Trx2p, las otras proteínas fundamentales del sistema TRX. Para ello se analizaron diferentes marcadores redox en los mutantes simples de las tiorredoxinas citosólicas 1 y 2, *trx1Δ* y *trx2Δ* y en el doble mutante de ambas, *trx1Δtrx2Δ*, en la cepa haploide industrial C9.

4.1 Respuesta al estrés oxidativo

4.1.1. Crecimiento en medios con agentes oxidantes y reductores

Se realizaron goteos con el doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas *trx1Δtrx2Δ* y se utilizó como control el mutante de la tiorredoxina reductasa 1, *trr1Δ*, que, como hemos comentado en el capítulo anterior, es la encargada de dar poder reductor para el ciclo catalítico de las tiorredoxinas. En la Figura 4.1 se muestran los resultados obtenidos con diferentes agentes causantes de estrés, reductor y oxidativo. Se utilizó H₂O₂ como agente oxidante ya que produce una regulación de los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina y también de la ruta de las pentosas fosfato. A nivel transcripcional se produce la activación de los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p, así como de los factores general Msn2/4 implicados en diferentes respuestas a estrés ambiental (Gasch et al., 2000; Ikner and Shiozaki, 2005; Temple et al., 2005). En respuesta a H₂O₂, el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* es capaz de crecer a concentraciones 1 mM y 2 mM mientras que a 3 y 4 mM no hay crecimiento, y sería esperable que el mutante *trr1Δ* tuviera un comportamiento similar por la relación funcional a la delección de *TRX1* y *TRX2* cosa que, como ya hemos visto en el capítulo anterior, no ocurre en muchos aspectos estudiados. En este caso, el mutante *trr1Δ* se comporta igual que el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en respuesta a H₂O₂ 3 mM, es decir, no hay crecimiento.

También se ensayó el efecto de la diamida, un reactivo sulfhidrilo que oxida los grupos sulfhidrilo de las cisteínas a la forma disulfuro. Se ha descrito mayor tolerancia del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* a este compuesto (Kosower et al., 1969). Como se puede observar en la Figura 4.1, los mutantes *trx1Δtrx2Δ* y *trr1Δ* no ofrecen una mayor sensibilidad al compuesto. De hecho crecen peor que la cepa silvestre ya en la condición control y la adición de diamida no incrementa este defecto de crecimiento. Por lo tanto, en cepas vnicas industriales no ocurre esta mayor tolerancia a la diamida en ausencia de tiorredoxinas.

Se utilizó el compuesto DTT (1,4-ditiotreitol) como agente reductor ya que se había descrito las tiorredoxinas como necesarias para hacer frente al estrés reductor (Trotter and Grant, 2002), a concentración 1 mM y tanto el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* como el mutante *trr1Δ* crecen en presencia de 1 mM de DTT a niveles similares que la condición control, siendo quizás un poco más severo el defecto en el caso del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*.

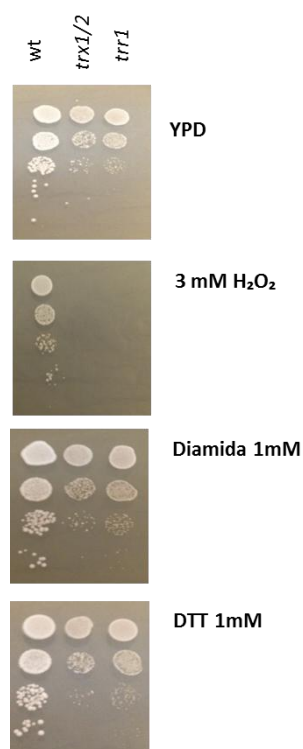


Figura 4.1 Respuesta al estrés oxidativo y reductor. Goteos en placa de YPD con diferentes agentes oxidantes y reductores. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3mM, diamida 1mM y 1,4-ditiotreitol (DTT) 1mM.

Estos experimentos confirman el papel de las tiorredoxinas citosólicas en la respuesta a estrés por peróxido de hidrógeno en cepas vínicas, aunque su papel puede ser secundario en relación a otros compuestos oxidantes como la diamida o a un estrés reductor. A continuación, se estudian otros parámetros y marcadores del estrés oxidativo en estas cepas.

4.1.2. Niveles de glutatión y catalasa

Como ya se ha mencionado en la Introducción, el glutatión es un tripeptido que actúa fundamentalmente como detoxificador de las especies reactivas tanto del oxígeno como del nitrógeno. La homeostasis del glutatión es indispensable para la célula ya que diversos factores que aumentan el nivel de estrés mediante la producción de ROS alteran la relación de glutatión reducido frente oxidado. Se ha demostrado el papel del glutatión como molécula de protección frente al estrés oxidativo a través de una modificación postraduccional en la cual el glutatión se une de manera reversible a los grupos tiol de las cisteínas de las proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo. En esta modificación reversible están implicados los sistemas tiorredoxinas y glutarredoxinas, teniendo un papel importante las tiorredoxinas en la deglutatión, es decir, en la eliminación del glutatión unido a la proteína una vez el estrés oxidativo ya ha pasado (Greetham et al., 2010).

Otros autores describen a las glutarredoxinas como las deglutathioniladoras de manera que, en función del medio y del estado de crecimiento, el sistema TRXs/GRXs juega un papel u otro (Beer et al., 2004; Mieyal and Chock, 2012). Las cisteínas de las proteínas son también susceptibles de oxidación irreversible, de manera que esta modificación es muy importante para la protección, y para la regulación de la función de muchas proteínas (Cooper et al., 2011; Ghezzi and Bonetto, 2003; Greetham et al., 2010; Meyer et al., 2009). En distintos trabajos, se ha descrito el efecto que tiene el medio de crecimiento sobre las defensas oxidativas de la levadura. Se ha descrito que los niveles de glutatión total son más elevados en medio rico YPD exponencial y podría ser debido a que durante el metabolismo fermentativo, se produce metilglioxal, un subproducto tóxico de la glicólisis, a partir de las triosas fosfato, cuya detoxificación es dependiente de glutatión y por ello es necesaria una mayor producción del glutatión total (Aguilera and Prieto, 2004; Bito et al., 1997; Macierzynska et al., 2007; Martins et al., 2001a, 2001b).

Debido al papel de la homeostasis del glutatión en la función celular bajo condiciones de estrés y a su papel en la protección reversible de proteínas, se decidió estudiar los niveles de glutatión intracelular así como de glutatión unido a proteína y la actividad catalasa en la cepa silvestre y en el doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas *trx1Δtrx2Δ*, en medio mínimo completo SC en dos estados diferentes, exponencial y estacionario, relevante para relacionarlo con las condiciones de envejecimiento cronológico. En la Figura 4.2 A se muestra los niveles de glutatión de células en fase exponencial y en fase estacionaria en los mutantes simples de las tiorredoxinas, en el doble mutante y en la cepa silvestre. Como se puede observar, el glutatión total en la cepa silvestre es, de media, 18 nmoles/mg célula en estado exponencial, mientras que en estado estacionario disminuye a 10 nmoles/mg célula. En estado exponencial, la levadura fermenta los azúcares presentes en el medio, sin embargo en estado estacionario las células no se dividen y mantienen su viabilidad mediante el uso de las reservas, principalmente glucógeno. Debido a que durante el cambio diaúxico entre la fase exponencial y la fase estacionaria se produce un cambio de metabolismo de fermentativo a respiratorio, aumentan las ROS producidas por la mitocondria, puede que el glutatión total se oxide, se una a las proteínas o se utilice como reserva para la síntesis de moléculas necesarias durante este cambio de metabolismo o durante la supervivencia en fase estacionaria. Por ello, vemos esa disminución en la cantidad de glutatión en la cepa silvestre. En cuanto a los mutantes simples *trx1Δ*, *trx2Δ*, también se observa esa disminución de glutatión total de la fase exponencial a la fase estacionaria. Sin embargo, esto no ocurre en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. En fase exponencial el doble mutante tiene más glutatión total que la cepa silvestre y que los mutantes simples, alrededor de 25 nmoles/mg célula y en estado estacionario, esta cantidad no se reduce significativamente como se observa en las demás cepas. Esto significa que las dos tiorredoxinas tienen una función redundante en el control de la síntesis de glutatión celular en fase estacionaria. Si nos fijamos en el glutatión oxidado o GSSG, no hay diferencias significativas entre la cepa silvestre y los mutantes simples en estado exponencial, pero si se observan niveles más altos en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, y lo mismo ocurre en fase estacionaria, indicando un mayor daño oxidativo. En SC exponencial los niveles de glutatión oxidado son más altos que en SC estacionario y eso se refleja en que la relación ratio entre reducido y oxidado es mayor en estado estacionario.

Resultados y Discusión

Es decir, el silvestre y los mutantes simples presentan similares niveles de glutatión tanto en estado exponencial como en estado estacionario. En el caso del doble mutante sí hay mucho más glutatión oxidado en fase estacionaria, indicando aumento de ROS. Es posible que aumente la síntesis de glutatión total para compensar la ausencia de las tiorredoxinas citosólicas.

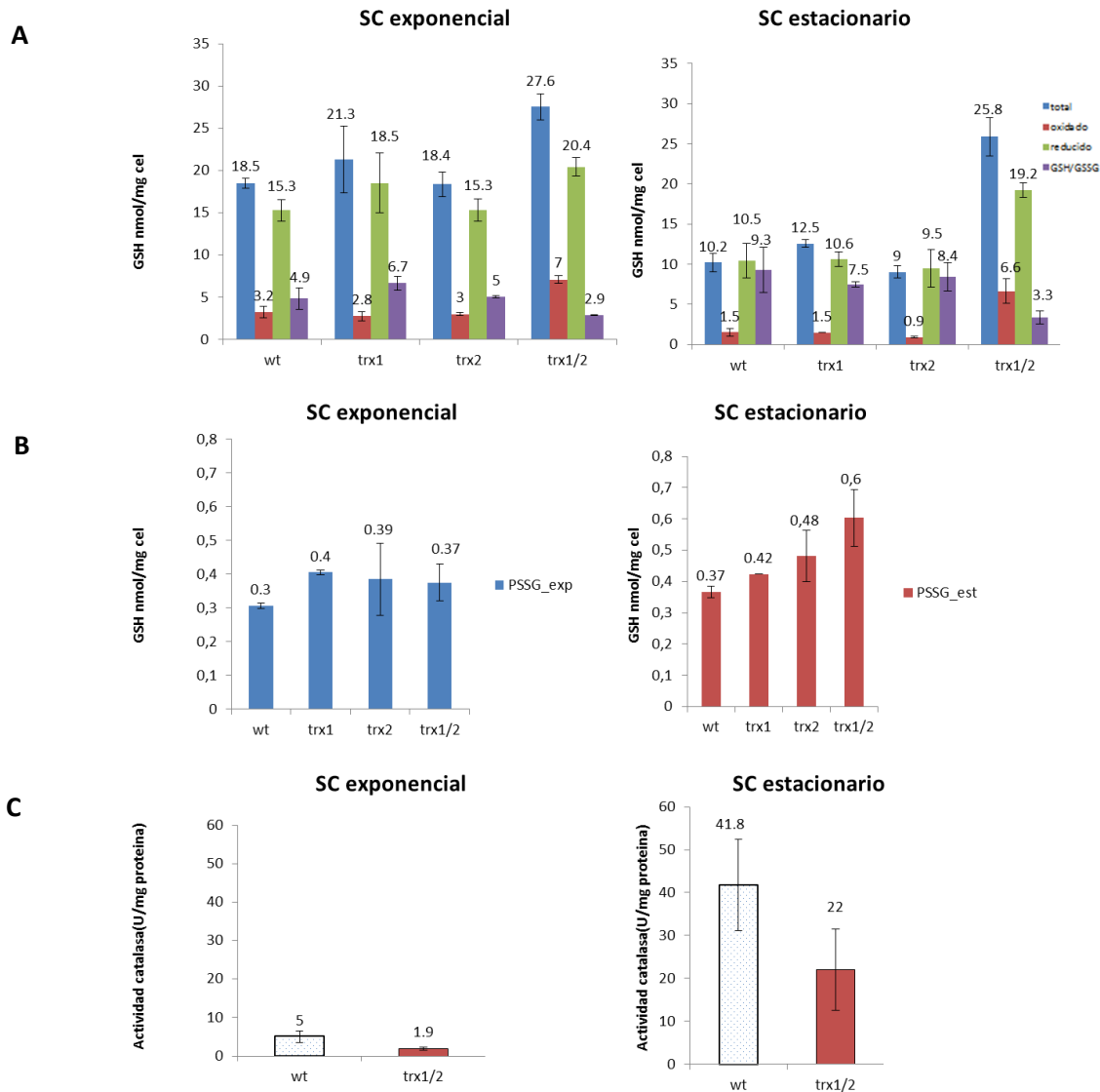


Figura 4.2 Medida de indicadores de estrés oxidativo en los mutantes simples de tiorredoxinas y en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Medida del glutatión total (GSH), oxidado (GSSG) y reducido (GSH) y de la relación entre glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en dos fases de crecimiento, estacionaria y exponencial en medio mínimo completo representado como nmoles de GSH por mg de célula **(A)**. Medida del glutatión unido a la proteína (PSSG) en las dos fase de crecimiento **(B)**. Medida de la actividad catalasa por mg de proteína en las dos fases de crecimiento **(C)**. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Debido al papel, anteriormente mencionado, de las tiorredoxinas como deglutationiladoras, se midió el glutatión unido a la proteína (PSSG) tanto en fase exponencial como en estacionaria, en las mismas condiciones que el experimento anterior, y tal y como se describe en el apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos. Algunos autores describen a las tiorredoxinas y no a las glutarredoxinas como únicas deglutationiladoras, dado que los mutantes *trx1Δtrx2Δ* en levaduras de laboratorio, presentan el mismo nivel de glutatión unido a la proteína (PSSG) en estado exponencial que en estado estacionario (Greetham et al., 2010). En la Figura 4.2 B se observan los niveles de glutatión unido a la proteína (PSSG) en nmoles/mg células. En la cepa silvestre hay un pequeño aumento (1 nmol/mg) del glutatión unido a la proteína del estado exponencial al estacionario, mientras que en cepas de laboratorio se ha descrito un aumento de más del doble de PSSG en fase estacionaria que en exponencial, sugiriendo un menor cambio en el estado redox según la fase de crecimiento. Si nos fijamos en los mutantes simples, *trx1Δ* no varía la cantidad de glutatión unido en función de la fase en la que se encuentre, siendo ligeramente superior a la cepa silvestre en fase exponencial. Los niveles de PSSG en *trx2Δ* en fase estacionaria aumentan un poco con respecto a la exponencial. En cuanto al doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, se observa un aumento del glutatión unido a la proteína en estado estacionario mayor que los mutantes simples, como sería esperable de una deficiencia en su propuesta actividad como deglutationiladoras (Greetham et al., 2010). Nuestros resultados sugieren, que en cepas industriales las tiorredoxinas no son las únicas que participan en este proceso ya que en el doble mutante de las tiorredoxinas hay diferencias en el glutatión unido a proteína de un estado a otro, es decir, se dispararía un mecanismo de compensación por la ausencia de las tiorredoxinas durante la fase exponencial principalmente. En este mecanismo de compensación podrían estar implicadas las glutarredoxinas que han sido descritas como glutationiladoras y deglutationiladoras.

Como se ha comentado en la introducción, las catalasas forman parte del sistema de detoxificación celular, reduciendo el H_2O_2 a H_2O y O_2^- , por lo que se midió la actividad catalasa (tal como se describe en el apartado 4.5.1 de Materiales y Métodos) en las mismas condiciones que se determinó el nivel de glutatión. El análisis espectrofotométrico de la actividad es incapaz de discriminar entre las dos catalasas celulares (Ctt1p y Cta1p) ya que se parte de extractos crudos de proteína total. Se sabe que la catalasa citoplasmática (Ctt1p) es la principal responsable de la actividad catalasa en células cultivadas con elevada concentración de glucosa donde el metabolismo es predominantemente fermentativo, mientras que cuando el metabolismo es puramente oxidativo, ambas catalasas participan por igual (Lushchak and Gospodaryov, 2005). En la Figura 4.2 C, la actividad catalasa en estado exponencial de la cepa silvestre es superior a la del doble mutante. Este resultado sugiere que la actividad catalasa sorprendentemente no se activa para compensar la falta del sistema TRX. En estado estacionario, la actividad catalasa aumenta unas 10 veces más pero este aumento es proporcional en las dos cepas, es decir, que no hay diferencia significativa entre el aumento de actividad catalasa en estado estacionario en el doble mutante y la cepa silvestre, aunque en esta la actividad catalasa en estado exponencial es mayor.

Por otro lado, se ha observado que la actividad catalasa es mayor en células donde el metabolismo es respiratorio debido al aumento de producción de ROS por la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y ello hace que se incrementen las defensas antioxidantes celulares, lo que sugiere que los niveles de ROS sería más altos en fase estacionaria y en la cepa silvestre que en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*.

Se ha descrito la conexión entre el sistema glutatión y el sistema catalasa (Grant et al., 1998) ya que existen indicios de que la actividad catalasa resulta fundamental cuando los niveles de glutatión disminuyen. Esto concuerda con los resultados que obtenemos en la cepa silvestre en la que en fase estacionaria disminuye los niveles de glutatión total y aumenta unas 10 veces la actividad catalasa. No ocurre igual con el doble mutante en cuanto a inducción, ya que a pesar de mantener los niveles de glutatión total independientemente del estado de crecimiento en el que se encuentre, sí que se observa un aumento en la actividad catalasa en estado estacionario. Sin embargo el nivel de glutatión es mayor en el doble mutante en todas las condiciones, sugiriendo que sí que operan mecanismos reguladores que suplan la menor cantidad de actividad tiorredoxina.

4.2. Estudios de crecimiento y longevidad y su relación con el sistema tiorredoxina

4.2.1. Envejecimiento cronológico en los mutantes TRX en medio del laboratorio

Se realizaron ensayos de envejecimiento cronológico con los mutantes simples *trx1Δ* y *trx2Δ* y doble *trx1Δtrx2Δ* en medio mínimo completo SC. En la Figura 4.3 se muestra el porcentaje de viabilidad de dichas cepas con el paso del tiempo, tomando el día 3 de crecimiento en este medio como 100% de viabilidad. Tanto el mutante simple *trx1Δ* como el *trx2Δ* no presentan diferencias significativas en la longevidad cronológica. Si nos fijamos en la viabilidad del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, se puede observar que el porcentaje de supervivencia es mucho menor que el de los mutantes simples y que el de la cepa silvestre. Como se indica en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos, en medio mínimo completo SC a día 1 de crecimiento la levadura ha consumido todos los azúcares presentes en el medio (2%) y ocurre un cambio diáxico, de un metabolismo fermentativo de la glucosa a un metabolismo respiratorio del etanol producido. Una vez transcurren 2-3 días de crecimiento en este medio, la levadura se encuentra en estado estacionario, de no división celular, donde la levadura sobrevive con la reserva almacenada en forma de glucógeno. En estas condiciones, la viabilidad de las células va a depender de las reservas almacenadas por lo que disminución de viabilidad del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, nos indica que el sistema tiorredoxina podría ser necesario para la supervivencia cuando los nutrientes se han agotado y que es necesario para hacer frente al daño oxidativo producido durante la fase de crecimiento y durante la respiración del etanol. Se ha demostrado en diversos artículos que la función de *TRX1* y *TRX2* es complementaria y redundante, con algunas funciones diferenciadas, por ello no se observa un defecto en la viabilidad en los mutantes simples.

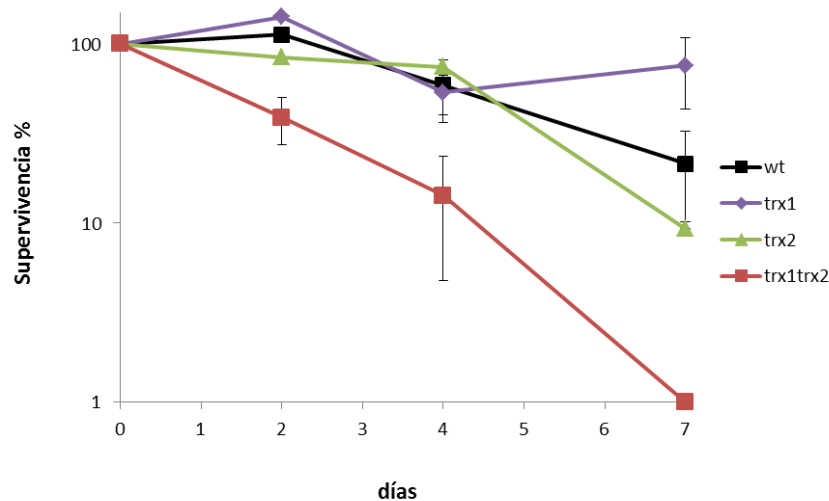


Figura 4.3 Papel de las tiorredoxinas citosólicas en longevidad. Experimentos de longevidad cronológica (LC) en la cepa haploide vínica industrial C9 y en los mutantes simples de las tiorredoxinas citosólicas, *trx1Δ* y *trx2Δ* y doble *trx1Δtrx2Δ* en medio mínimo completo (SC). Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento, representándose la supervivencia en porcentaje y en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

4.2.2. Crecimiento y Envejecimiento cronológico en los mutantes TRX en mosto sintético

Para ver el efecto de las tiorredoxinas en la fermentación alcohólica, se realizaron microvinificaciones en mosto sintético MS300 ya que es un medio de laboratorio mucho más homogéneo y reproducible que el mosto natural (apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos) y nos permite comparar con experimentos anteriores del grupo o con experimentos globales de otros laboratorios, como por ejemplo a nivel transcriptómico (Rossignol et al., 2003). Se analizó el crecimiento y la supervivencia por recuento de unidades formadoras de colonias, Como ya se ha comentado en varias ocasiones el mosto sintético contiene 200g/L de azúcares reductores (glucosa+fructosa) de manera que el metabolismo predominante es fermentativo durante los 7-10 días (según la cepa) necesarios para consumir los azúcares.

En la Figura 4.4 A se representa el crecimiento de los mutantes TRX y de la cepa silvestre C9 a lo largo del tiempo de fermentación, y se observa que no hay diferencias significativas entre los mutantes simples *trx1Δ* y *trx2Δ* con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, se observa un crecimiento mucho menor en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, que alcanza una menor densidad de células viables que el resto de cepas. Se han descrito numerosos efectos de la ausencia de las TRXs que pueden explicar el defecto de crecimiento en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, una prolongación de la fase S del ciclo celular debido a la ineficiente reducción de la ribonucleótido reductasa (RNR), que es dependiente de tiorredoxinas. Este defecto en la función de la RNR provoca una disminución de la síntesis de dNTPs.

Resultados y Discusión

Además, también participan en la reducción de la 3-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa (PAPS reductasa) requerida para la asimilación de sulfuro (Herrero et al., 2008; Meyer et al., 2009; Tan et al., 2010). La ausencia de las tiorredoxinas produce también la hiperoxidación de las cisteínas de las TRX peroxidasas como son Tsa1p, Tsa2p, Ahp1p y Prx1p (Le Moan et al., 2006). Para estudiar la evolución de la fermentación, se midió el consumo de azúcares extracelulares a lo largo de la fermentación, datos que se muestran en la Figura 4.4 B.

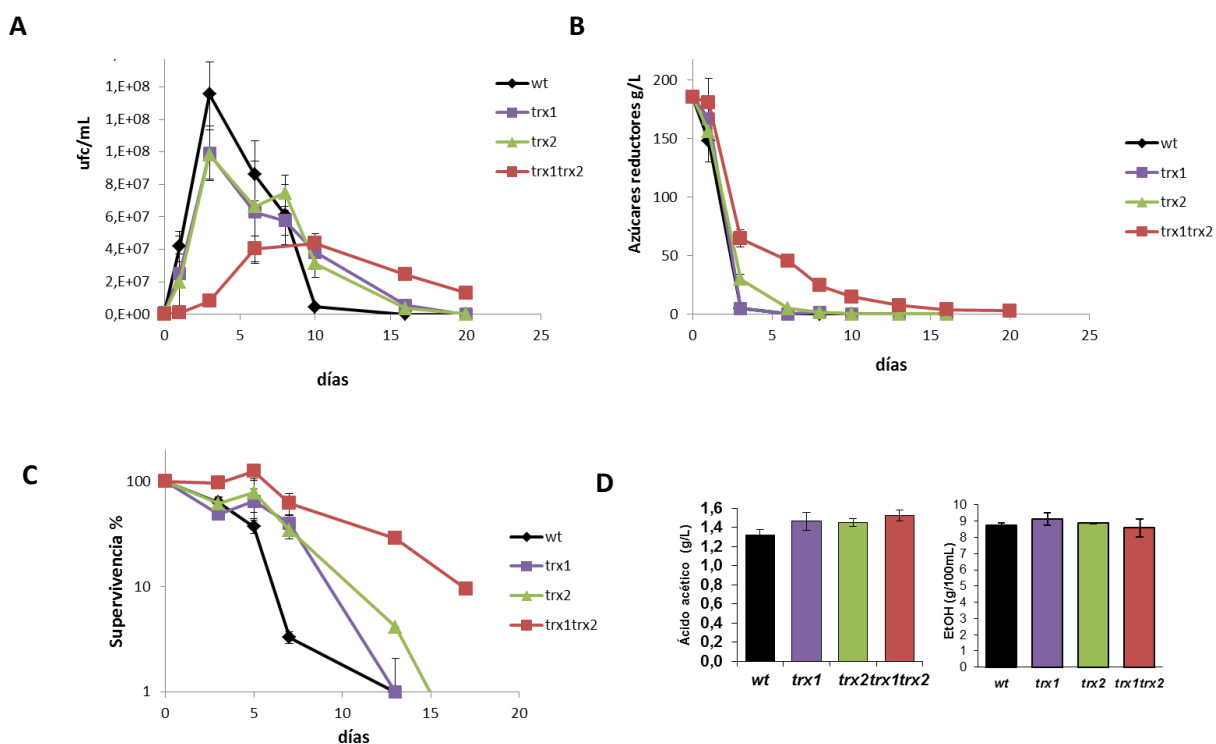


Figura 4.4 Papel de las tiorredoxinas citosólicas en longevidad cronológica en mosto sintético MS300. Curvas de crecimiento de los mutantes *trx1* Δ , *trx2* Δ y del doble mutante *trx1* Δ *trx2* Δ . Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (A). Perfiles de consumo de los azúcares reductores presentes en el medio (B). Curvas de supervivencia tomando el día 3 de crecimiento del panel A como 100% de viabilidad (C). Determinación de etanol y ácido acético al final del proceso de fermentación (D). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Se observa que las células siguen consumiendo los azúcares una vez llegado a su máximo de densidad celular, y no se observan diferencias significativas entre los mutantes simples y la cepa silvestre pero, al igual que ocurre con el crecimiento, el consumo de los azúcares en el *trx1* Δ *trx2* Δ es mucho más lento que en el resto de cepas, indicando un metabolismo ralentizado posiblemente debido al menor número de células, a pesar de lo cual es capaz de completar la fermentación.

Utilizando el máximo de densidad celular como 100% de viabilidad, se obtienen las curvas de supervivencia o envejecimiento cronológico que se muestran en la Figura 4.4C. Tanto el mutante simple *trx1Δ* como el *trx2Δ* presentan un pequeño aumento en la viabilidad media, mostrando una longevidad máxima similar. En el doble mutante se observa una clara extensión de la longevidad cronológica y a día 26 de crecimiento en mosto la viabilidad del doble mutante todavía es superior al 10%. Este efecto es posiblemente debido a su menor tasa de metabolismo fermentativo (menor crecimiento y una velocidad de consumo de los azúcares ralentizada).

En la Figura 4.4 D se muestran los valores de ácido acético y etanol al final de la fermentación (cuando el porcentaje de glucosa en el medio es menor al 2%), correspondiente al día 7 para los mutantes simples y la cepa silvestre y al día 16 para el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Al final del proceso fermentativo, todas las cepas presentan la misma concentración de etanol y de ácido acético. Esto demuestra que, a pesar de tener un metabolismo más lento, el doble mutante al final de la fermentación es capaz de producir la misma concentración de etanol y de ácido acético que el silvestre.

4.2.3. Envejecimiento cronológico en mosto natural. Variedad tempranillo

Se realizó el mismo experimento en mosto natural de la variedad tempranillo para determinar si las diferencias entre un mosto natural y otro sintético, como la presencia de polifenoles antioxidantes, pueden influir en el fenotipo de los mutantes de interés. Se utilizó el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre para simplificar el experimento ya que los mutantes simples de las tiorredoxinas no muestran fenotipos significativos. Como se puede observar en la Figura 4.5 en mosto natural se observa el mismo fenotipo de crecimiento, de consumo de azúcares y de producción de metabolitos que en mosto sintético (Fig 4.4), destacando un crecimiento mucho más lento del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. En la Figura 4.5C, se muestran las curvas de supervivencia utilizando el día 12 de crecimiento como 100% de viabilidad que, de nuevo, indican la extensión de LC del doble mutante. Se pueden encontrar en la bibliografía numerosos ejemplos de evidencias a favor y de evidencias en contra de la teoría del envejecimiento por estrés oxidativo de Harman. Se ha descrito, por ejemplo, que un aumento en las ROS produce una inducción de la actividad enzimática antioxidante que finalmente lleva a la extensión de la vida (Ristow and Schmeisser, 2011).

El mutante de las tiorredoxinas citosólicas, *trx1Δtrx2Δ*, tiene una deficiencia en la protección y detoxificación frente al estrés oxidativo (Figura 4.1) lo que hace que tenga una mayor adaptabilidad al medio y extienda la longevidad. En condiciones fermentativas tanto de mosto sintético como en mosto natural se observa una extensión en la supervivencia del *trx1Δtrx2Δ* en estado de no división, que podría ser explicado como un mecanismo de adaptación al estrés por tener un crecimiento y un metabolismo más ralentizado y una menor defensa al estrés oxidativo.

Resultados y Discusión

La teoría de envejecimiento por estrés oxidativo encajaría con los resultados observados en la Figura 4.3, en los que la caída de LC del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* se podría relacionar con una mayor acumulación de ROS, ya que las células se encuentran en un estado estacionario posterior al metabolismo respiratorio del etanol producido durante la fermentación de la glucosa del medio. Sin embargo, cuando el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* se encuentra en un medio rico en azúcares, en el que predomina el metabolismo fermentativo y no se genera abundante estrés oxidativo por la cadena de transporte mitocondrial, su longevidad cronológica es mayor.

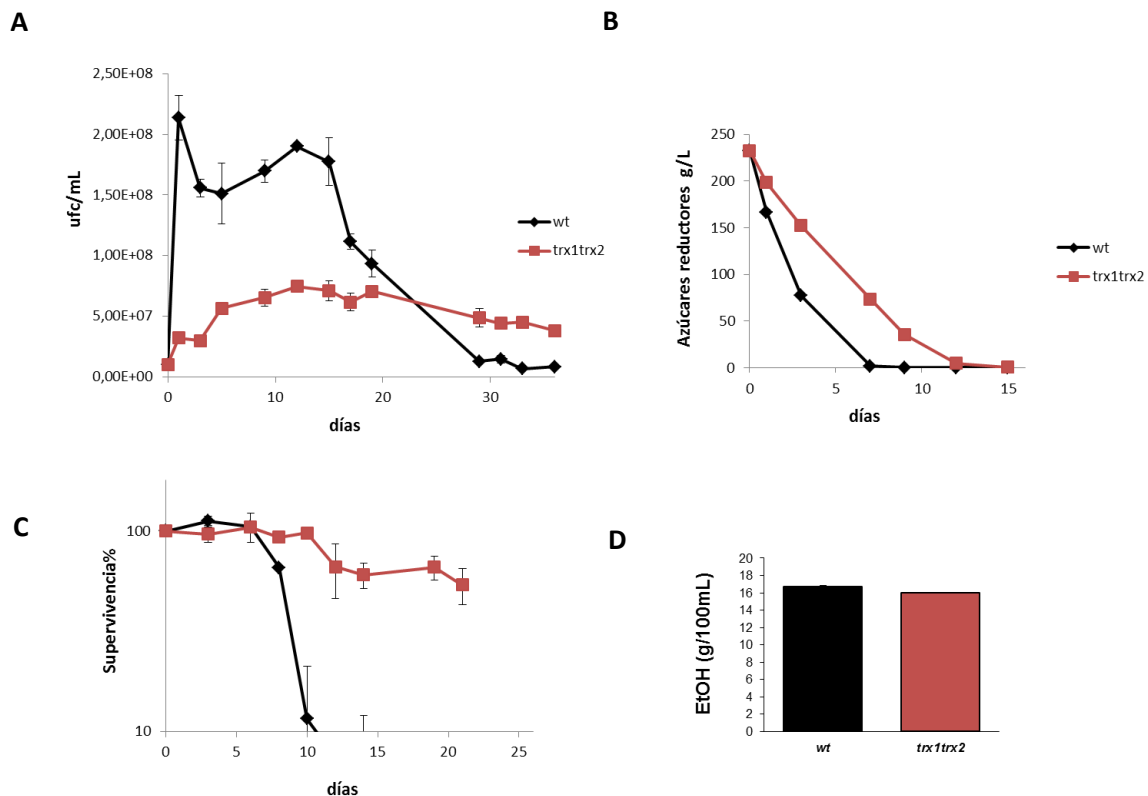


Figura 4.5 Papel de las tioredoxinas citosólicas en longevidad en mosto natural variedad tempranillo. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre y del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Se representa las unidades formadoras de colonia por mL por recuento en placa a distintos tiempo de fermentación (**A**). Perfiles de consumo de los azúcares reductores presentes en el medio (**B**). Curvas de supervivencia tomando el día 3 de crecimiento del panel A como 100% de viabilidad (**C**). Determinación de etanol y ácido acético al final del proceso de fermentación (**D**). Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

4.3 Caracterización proteómica del doble mutante *trx1Δtrx2Δ*

Todos los resultados descritos sugieren la implicación de las tiorredoxinas en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo y la longevidad cronológica, pero de forma diferente en distintas condiciones fisiológicas. Con el fin de investigar en profundidad los efectos de la ausencia de las tiorredoxinas citoplasmáticas en la cepa vínica silvestre C9 en diferentes medios de cultivo y estados de crecimiento, se realizaron estudios proteómicos globales en colaboración con el laboratorio del Dr José Antonio Bárcena, de la Universidad de Córdoba. Estos estudios tenían un doble objetivo, por un lado, estudiar diferencias cuantitativas en la abundancia de las proteínas entre la cepa silvestre y el doble mutante de las tiorredoxinas, y por otro lado, el análisis del proteoma tiol redox para la identificación de proteínas redox diana, reguladas por las tiorredoxinas, que explicasen los fenotipos observados. Las condiciones concretas ensayadas fueron: crecimiento en medio SC tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, crecimiento en YPD fase exponencial y crecimiento en mosto sintético. Se define el proteoma tiol redox como el grupo de proteínas con residuos de cisteínas especialmente susceptibles de oxidación de manera reversible, de manera que su análisis nos daría información sobre la respuesta antioxidante de la célula. Se han descrito diferentes proteínas, implicadas en la respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂, que son susceptibles de modificación reversible en las cisteínas.

Por ejemplo, en condiciones normales de crecimiento exponencial, Trx1p, Ahp1p y Sod1p se encuentran modificadas así como proteínas pertenecientes a la ruta glicolítica, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, Gapdh1p, y la piruvato descarboxilasa, Pgc1p entre otras. En condiciones de estrés por H₂O₂ se detectaron proteínas del ciclo de Krebs y también proteínas implicadas en la traducción con residuos de cisteínas susceptibles de este tipo de modificación reversible (McDonagh et al., 2011a, 2011b).

La metodología empleada (McDonagh et al., 2014) se describe en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos y se muestra esquemáticamente en la Figura 4. 6 para una mejor comprensión. Tal como se resume en la Figura 4.6 se utilizó los datos de espectrometría de masas (MS) para realizar dos análisis diferentes. Por un lado, un análisis cuantitativo de la abundancia de las proteínas detectadas entre las dos cepas que proporciona diferencias significativas, y por otro lado, el análisis de los péptidos tripticos que contienen residuos de cisteína con los marcajes diferenciales utilizados para analizar su estado de oxidación reversible.

Resultados y Discusión

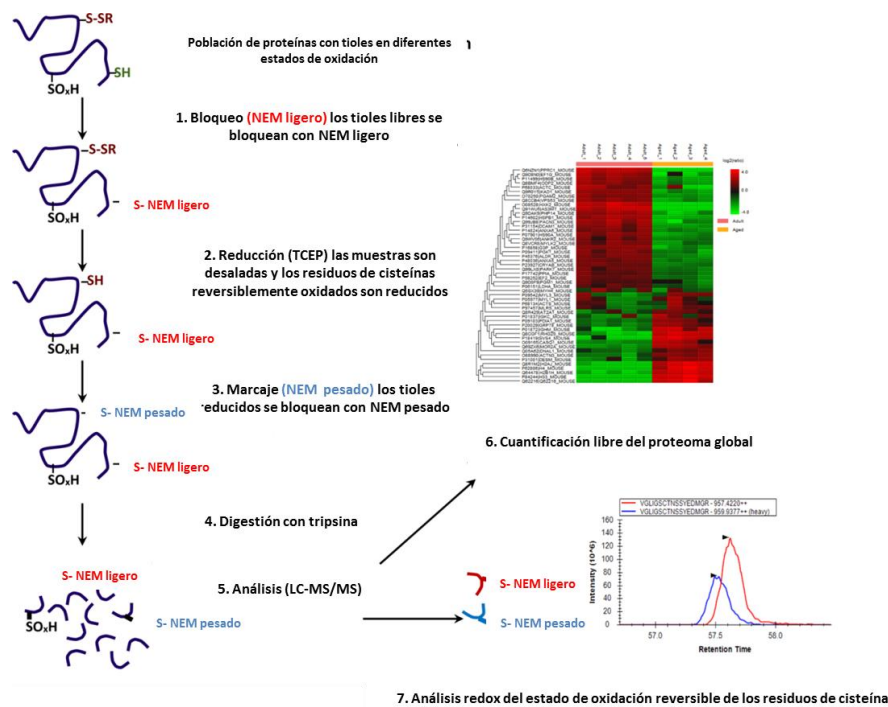


Figura 4.6 Figura resumen del procedimiento para el análisis del proteoma tiol redox. Los detalles de la extracción y posterior análisis se encuentran en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. (Adaptado de McDonagh et al., 2014).

4.3.1 Proteoma redox tiólico

4.3.1.1 Análisis de las cisteínas oxidadas reversiblemente

En la Tabla 4.1 se muestran las diferentes proteínas identificadas en base a sus péptidos redox analizados. En la primera columna se muestra el código Uniprot de cada una de las proteínas, en la segunda columna la descripción de la proteína identificada, a continuación la cisteína susceptible de oxidación y su posición en la secuencia peptídica de la proteína que se ha detectado como péptido redox y a continuación, cuatro columnas con los cuatro experimentos realizados donde se muestra la relación entre las áreas de las señales, detectadas mediante el análisis del programa Skyline, correspondientes al marcaje con el isótopo ligero (estado reducido) y el marcaje con el isótopo pesado (estado oxidado).

Se muestran los valores de dicha relación (red/ox) para la cepa silvestre y para el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* así como, la relación (mut/wt) entre el cociente reducido/oxidado del doble mutante y el cociente reducido/oxidado de la cepa silvestre.

Sólo se han identificado siete proteínas que contienen péptidos redox: Sod1p, Rps29Ap, Rps22Ap, Rps29Ap, Rpl43A, Cpr3p y Gre3p.

Tabla 4.1

Código Uniprot	Proteína	Redox cys	SC	SC	YPD	Fermentación en mosto sintético
			Exponencial RATIO Red/oxi	Estacionario RATIO Red/oxi	Exponencial RATIO Red/oxi	RATIO Red/oxi
P00445	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] (SOD1)	Cys 146	wt 0.45	wt 0.3	wt 56.62	wt 25.2
			<i>trx1trx2Δ</i> 0.06 MUT/WT=0.13	<i>trx1trx2Δ</i> 0.43 MUT/WT= 1.43	<i>trx1trx2Δ</i> 13.76 MUT/WT=0.24	<i>trx1trx2Δ</i> 2.42 MUT/WT= 0.09
P41057	Proteína ribosomal S29-A del 40S (RPS29A)	Cys 38	wt 0.63		wt 31.34	
			<i>trx1trx2Δ</i> 15.35 MUT/WT=24.4		<i>trx1trx2Δ</i> 77.2 MUT/WT=2.46	
P0CX25	Proteína Ribosomal L43A del 60S (RPL43A)	Cys 38		wt 5.3	wt 8.71	wt 41.72
				<i>trx1trx2Δ</i> 3.6 MUT/WT=0.7	<i>trx1trx2Δ</i> 11.61 MUT/WT=1.33	<i>trx1trx2Δ</i> 0.21 MUT/WT=0.005
P41058	Proteína ribosomal S29-B del 40S (RPS29B)	Cys 38	wt 2.37			
			<i>trx1trx2Δ</i> 0.39 MUT/WT=0.16			
P41058	40S ribosomal protein S29-B (RPS29B)	Cys 23	wt 2.47			
			<i>trx1trx2Δ</i> 4.11 MUT/WT=1.66			
P0C0W1	Proteína ribosomal S22-A del 40S (RPS22A)	Cys 71	wt 5.2		wt 3.21	
			<i>trx1trx2Δ</i> 3.45 MUT/WT=0.66		<i>trx1trx2Δ</i> 18.56 MUT/WT=5.8	

Continuación Tabla 4.1

Código Uniprot	Proteína	Redox cys	SC		YPD	Fermentación en mosto sintético RATIO Red/oxi
			Exponencial RATIO Red/oxi	Estacionario RATIO Red/oxi	Exponencial RATIO Red/oxi	
P25719	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa C, mitocondrial (CPR3)	Cys 57		wt 20.5		
				<i>trx1trx2Δ</i> 6 MUT/WT=0.29		
P38715	aldosa reductasa NADPH-dependiente GRE3 (GRE3)	Cys 27		wt 1,84		
				<i>trx1trx2Δ</i> 0,5 MUT/WT=0,27		

Tabla 4.1 Relación entre las cisteínas reducidas y las oxidadas en el doble mutante de las tiorredoxinas y en la cepa silvestre. Se representa la relación entre las cisteínas reducidas, marcadas con NEM ligero, y las oxidadas, marcadas con D5-NEM pesado, en los cuatro experimentos realizados en las dos cepas utilizadas. En la tabla se representa la cisteína que ha sido modificada así como la proteína a la que pertenece. Entre paréntesis se muestra la relación entre los valores de los cocientes reducido/ oxidado del doble mutante y de la cepa silvestre. En verde los que presentan el ratio menor que 1 y en rojo los que presentan el ratio mayor que 1.

De estas siete, cuatro de ellas son proteínas ribosomales (Rps29A, Rps22A, Rps29A, Rpl43A). Dos de ellas, Rps29Ap y Rps22Ap son proteínas ribosomales de la subunidad 40S y han sido detectadas en los experimentos de crecimiento exponencial en medio con 2% de glucosa, tanto SC como YPD. En Rps29Ap es la cisteína 38 la que se encuentra modificada tanto en SC como en YPD. Esta cisteína se encuentra más oxidada en la cepa silvestre mientras que en el doble mutante se encuentra más reducida. En Rps22Ap es la cisteína 71 la que ha sido detectada como péptido redox. En este caso, en el medio SC exponencial, el doble mutante de las tiorredoxinas presenta esta Cys más oxidada que la cepa silvestre y, sin embargo, en YPD exponencial la cisteína 71 se encuentra más reducida en el mutante *trx1Δtrx2Δ*. De estas proteínas ribosomales, una de ellas, la Rps29B se ha detectado únicamente en el experimento de SC exponencial, es una proteína de la subunidad 40S que tiene dos cisteínas oxidables reversiblemente, la cisteína localizada en la posición 38 y la cisteína localizada en la posición 23. En el caso de la cisteína 38, se encuentra más oxidada en el doble mutante mientras que la cisteína 23 se encuentra más reducida en el doble mutante.

La última de las proteínas ribosomales es la proteína Rpl43A, de la subunidad 60S, y se ha detectado en todos los medios analizados excepto en el medio SC exponencial.

Si observamos los medios en condiciones estacionarias como es el SC estacionario o en crecimiento en mosto, la cisteína 38 de la Rpl43A se encuentra más oxidada en el doble mutante que en la cepa silvestre. En cambio, en medio YPD exponencial, la cisteína 38 se encuentra más reducida en el doble mutante. Debido a la elevada presencia de proteínas ribosomales en el estudio proteómico global así como en el estudio del proteoma tiólico, se analizó la respuesta del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* a la inhibición de la traducción con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, que actúa interfiriendo en la actividad de la peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. En la Figura 4.7 se muestra el resultado de estos experimentos en la cepa silvestre, en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, y en el mutante de la tiorredoxina reductasa 1, *trr1Δ*, observándose que el mutante *trx1Δtrx2Δ* tiene una mayor resistencia a la cicloheximida ya que presenta un menor halo de inhibición de crecimiento, lo que sugiere que activa la maquinaria de traducción y es capaz de tolerar mejor la inhibición por cicloheximida y crecer mejor en parte, podría ser explicado por una mayor abundancia en el número de proteínas detectadas en el análisis global como proteínas ribosomales y también podría ser explicado por la regulación de algunas de estas proteínas ribosomales (Figura 4.1), a través de la oxidación/reducción de sus cisteínas por el sistema TRX. La falta de sensibilidad a cicloheximida del mutante en *TRR1* indica que el fenotipo observado no debe a una alteración de la respuesta a estrés oxidativo.

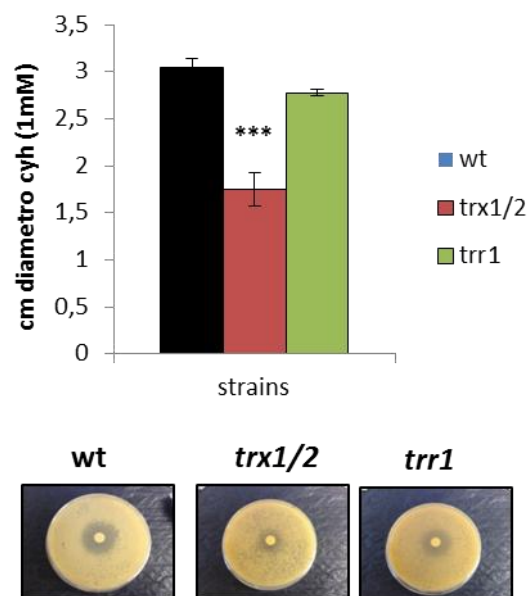


Figura 4.7 Halos de inhibición de crecimiento en presencia de cicloheximida 1mM. Se midió el diámetro del halo de inhibición en presencia del inhibidor de la traducción, cicloheximida 1mM, de la cepa silvestre, del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y, el mutante de la tiorredoxina reductasa *Trr1p*. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la desviación típica.

De las siete proteínas detectadas en el análisis tiólico redox, es interesante ver que las proteínas ribosomales se han detectado en fase de crecimiento exponencial, mientras que las relacionadas con la mitocondria se han detectado únicamente en fase estacionaria en medio SC (Tabla 4.1). Dos son las proteínas mitocondriales detectadas con cisteínas susceptibles de oxidación reversible en fase estacionaria, Cpr3p y Gre3p. Cpr3p es una ciclofilina que cataliza la isomerización cis-trans de residuos peptídicos de prolina. Está implicada en el plegamiento de proteínas después de su transporte a la mitocondria y esta isoenzima es requerida para el crecimiento en lactato a altas temperaturas. La cisteína 57 se encuentra mucho más oxidada en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre.

Gre3p presenta la cisteína 27 más oxidada en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre. Se trata de una aldosa reductasa dependiente de NADPH implicada en el metabolismo del metilglicoxal, D-xilosa, arabinosa y galactosa, que resulta inducida por estrés, osmótico, iónico, oxidativo, choque térmico, ayuno y metales pesados y regulada por la ruta de la MAP quinasa de respuesta a osmoestrés Hog1p. Se ha visto que, en presencia de estrés osmótico (con sorbitol), *GRE3* se acumulan en fase logarítmica, mientras que en ausencia de estrés se acumula durante el cambio diaúxico y fase estacionaria. Nuestros resultados son consistentes con la funcionalidad propuesta para Gre3p ya que la detección de proteína más oxidada en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* podría estar relacionada con señales reguladoras de su función, propia de la fase postdiauxica.

Como se muestra en la Tabla 4.1, la cisteína 146 de la Superóxido dismutasa 1, Sod1p, es la única que se ha detectado en todos los experimentos. En los tres experimentos donde predomina el metabolismo fermentativo (fase exponencial en SC y en YPD y mosto sintético), la cisteína 146 de Sod1p se encuentra más oxidada en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre. Sin embargo, en estado estacionario en SC, la cisteína 146 de la Sod1p se encuentra más oxidada en la cepa silvestre que en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Por ello, se decidió estudiar la actividad de Sod1p en diferentes condiciones.

4.3.2 Actividad de las superóxidos dismutasas en el mutante de las tiorredoxinas

Se estudió la actividad de la superóxido dismutasa en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* mediante zimograma (Gamero-Sandemetrio et al., 2013), tal y como se describe en 4.5.2 de Materiales y Métodos en medio SC en estado exponencial y estacionario y en medio YPD. Se incluyeron los mutantes simples *tsa1Δ* (Capítulo 2) y *trr1Δ* (Capítulo 3) con el fin de obtener información adicional sobre los mecanismos implicados en caso de detectar algún efecto en la actividad superóxido dismutasa en el mutante *trx1Δtrx2Δ*. La Figura 4.7 recoge los resultados del análisis y muestra el zimograma y la tinción con coomassie del gel como control de carga. Se observa que hay mayor actividad de Sod1p en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en el mutante de *trr1Δ* comparado con el mutante *tsa1Δ* y con la cepa silvestre. Como se ha comentado las SODs son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De acuerdo con la bibliografía, cuando Sod1p une cobre y zinc, sus cisteínas se encuentran reducidas y la proteína, activa.

Sin embargo, en nuestros datos, la cisteína 146 se encuentra más oxidada en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en medios fermentativos y la cisteína 57 totalmente reducida (sólo contienen dONEM) y, en esas condiciones presenta mayor actividad, lo cual contradice los datos bibliográficos. Lo que se ha descrito es que la cisteína 146 y la cisteína 57 forman un enlace disulfuro para la correcta función catalítica de Sod1p. En nuestros datos la cisteína 146 se encuentra más oxidada en el doble mutante, C57 reducida por lo que no se formaría el enlace disulfuro y esperaríamos menos actividad del enzima. Sin embargo, en la Figura 4.7 se observa que tanto en estado exponencial como en estacionario las superóxido dismutasas tienen mucha más actividad en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en el mutante de la tiorredoxina reductasa. Una posibilidad es la unión de glutatión a alguna de las cisteínas de la Sod1p para protegerla frente al estrés oxidativo y debido a que las TRX son deglutatióniladoras habría un defecto en la deglutatiónilación y por lo tanto, una modificación de la actividad de la proteína.

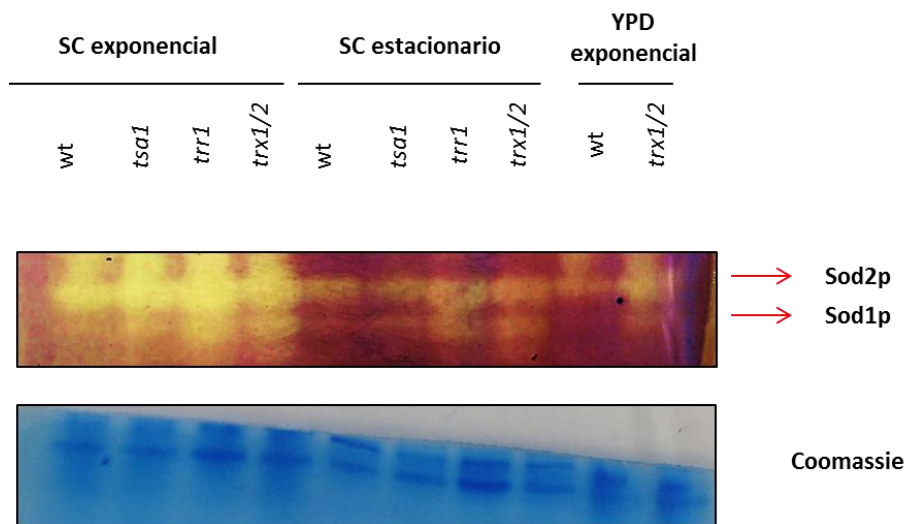


Figura 4.7 Actividad de las superóxido dismutasas 1 y 2 mediante zimograma. Análisis de actividad de las SODs en medio mínimo completo SC en estado de crecimiento exponencial y estacionario y en medio rico YPD en estado de crecimiento exponencial en la cepa silvestre C9, el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en los mutantes simples de *tsa1Δ* y el de *trr1Δ*.

4.3.3 Glutacionilación de Sod1p

Como se ha comentado en la Introducción, la glutacionilación de proteínas consiste en una modificación postraduccional de las cisteínas de las proteínas mediante la unión de glutatión para la protección y regulación de la actividad de la proteína frente a estrés oxidativo, en la que están implicados tanto el sistema tiorredoxina como el glutarredoxina.

Resultados y Discusión

Se decidió estudiar si Sod1p se encuentra glutacionilada en las condiciones de nuestros estudios para lo cual se etiquetó Sod1p con el epitopo *myc* en una de las copias cromosómicas del gen *SOD1*, tanto en la cepa silvestre haploide industrial C9 y como en el doble mutante de las tiorredoxinas *trx1Δtrx2Δ*, con el fin de poder inmunoprecipitar la proteína Sod1p, de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. En una primera aproximación, se utilizó todo el extracto crudo (*input*) de la inmunoprecipitación mediante perlas anti-*myc*, a partir de células procedentes de fase exponencial de crecimiento en YPD, para la detección con un anticuerpo frente a glutatión, anti-Gsh. Como se observa en la Figura 4.8, hay una mayor glutationilación en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, lo que resulta consistente en un mutante de las tiorredoxinas citosólicas, descritas como deglutacioniladoras.

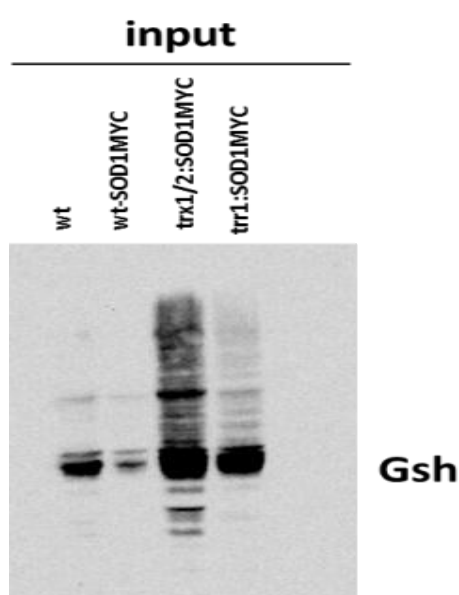


Figura 4.8 Análisis de la glutationilación de Sod1p. *Western blot* con un anticuerpo anti-GSH del *input* de la inmunoprecipitación de Sod1p-*myc* con un anticuerpo anti-*myc* inmovilizado.

Los experimentos que se realizaron siguiendo con los estudios realizados en el proteoma tiólico redox fueron: exponencial, SC exponencial y estacionario y a día 3 de crecimiento y a día 6. De esta forma, podríamos explicar el estado de oxidación de la cisteína 146 de la Sod1p con el papel de las tiorredoxinas en la deglutacionilación. Una vez comprobado que la coimmunoprecipitación de Sod1p y posterior detección con un anticuerpo específico de glutatión nos permitían detectar la glutationilación de Sod1p, se realizó una serie de experimentos en diferentes condiciones y fases de cultivo con la cepa silvestre C9 y su mutante *trx1Δtrx2Δ*. En la inmunoprecipitación y detección se introdujo, como control adicional, una muestra de la cepa silvestre sin la etiqueta *myc* en Sod1p (*mock*) y se realizó el análisis western blot con las fracciones purificadas de las cepas silvestre y mutante *trx1Δtrx2Δ* etiquetadas con *myc*, y el control sin etiquetar, y usando anticuerpos anti-GSH, para detectar glutationilación, y anti-MYC, como control de carga. Los experimentos se realizaron en condiciones no reductoras para poder observar la unión del glutatión.

En la Figura 4.9 se observa que efectivamente hay unión del glutatión a Sod1p, independientemente de la presencia o ausencia de las tiorredoxinas, pero de forma dependiente de las condiciones de cultivo y, por tanto, del estado fisiológico celular. La glutationilación de Sod1p es menor en fase estacionaria en medio SC, pero similar en la cepa silvestre y en el mutante *trx1Δtrx2Δ*.

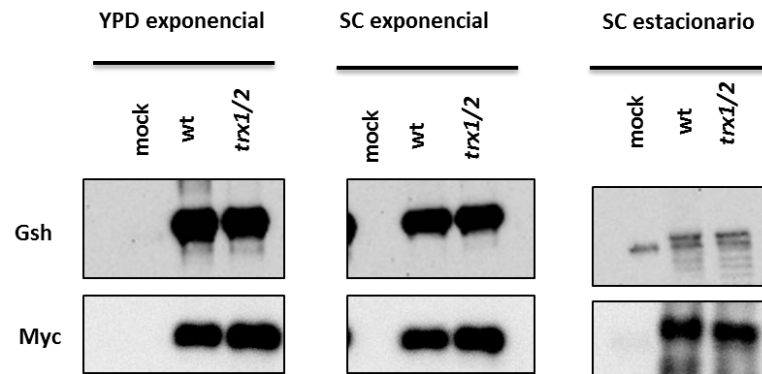


Figura 4.9 Análisis de la glutationilación de Sod1p. Western blot de la inmunoprecipitación de Sod1p en condiciones no reductoras para la detección de glutationilación en crecimiento exponencial y estacionario en medio mínimo completo SC en y exponencial en medio rico YPD.

EL hecho de que no haya diferencias en la glutationilación entre la cepa silvestre y el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* implica que, como se ha comentado, tiene que haber otras proteínas que actúen como deglutationiladoras y que, en ausencia de las tiorredoxinas citoplasmáticas, compensarían esta función (Dalle-Donne et al., 2007). Los resultados del análisis de glutationilación de Sod1p en la cepa silvestre C9 y en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, a los 3 y 6 días de vinificación en mosto sintético se muestran en la Figura 4.10. A ambos tiempos de crecimiento se detecta glutatión unido a Sod1p en ambas cepas pero en el día 6 de crecimiento se observan diferencias cuantitativas importantes, siendo mucho más elevado el grado de glutationilación en la cepa silvestre que en el doble mutante en el que su grado de glutationilación es de un 79% comparado con la cepa silvestre. Hay que destacar que este resultado es contrario a lo esperable si las tiorredoxinas actuaran como actividades deglutationiladoras de Sod1p, si bien hay que tener en consideración otros efectos de la ausencia de tiorredoxinas, como el estado redox celular, como se ha observado tanto en los goteos con oxidantes/reductores como la medida del glutatión y catalasa (Figura 4.1 y 4.2), que pueden ser también determinante para modular la glutationilación.

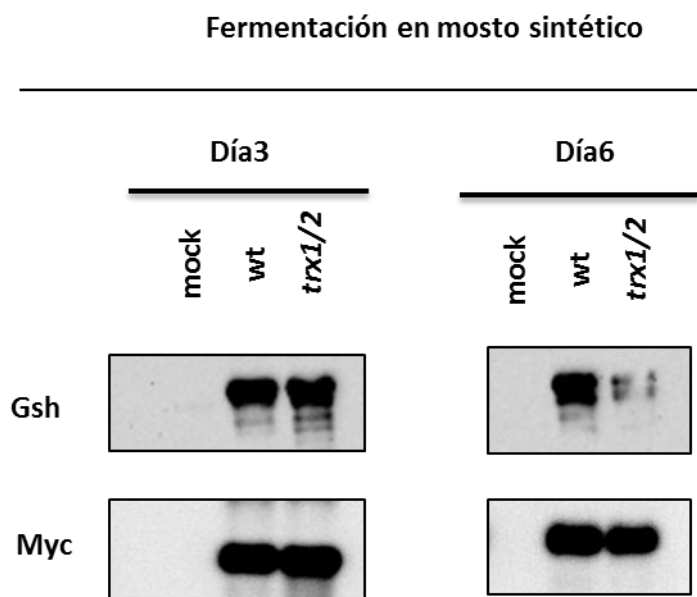


Figura 4.10 Análisis de la glutationilación de Sod1p en fermentación en mosto sintético. *Western blot* de la inmunoprecipitación de Sod1p en condiciones no reductoras para la detección de glutationilación en mosto sintético, a día3 y día 6 de crecimiento en este medio.

Los resultados de los experimentos de estudio de la superóxido dismutasa Sod1p, derivados del análisis del proteoma tiol, permiten concluir que su cisteína 146 está más oxidada en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase exponencial de crecimiento en YPD y en SC y que dicha oxidación no se debe fundamentalmente a glutationilación ya que no hay diferencias en el nivel de glutationilación de Sod1p entre la cepa silvestre y el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. En cambio, si que hay diferencias entre fase estacionaria y exponencial, observándose que, aunque independiente de tiorredoxinas, hay menor glutationilación de Sod1p en fase estacionaria que en exponencial. Esto resulta consistente con los datos del análisis de proteoma tiol que muestran que la cisteína 146 de la Sod1p se encuentra más oxidada en las condiciones de crecimiento exponencial en SC y en YPD y en mosto, y más reducida en fase estacionaria en medio SC. Según la bibliografía, esta oxidación de la cisteína 146 en fase exponencial impediría formar el disulfuro con la Cys 57 (que se encuentra reducida en todas las cepas y todos los experimentos) por lo que la actividad de la Sod1p, que requiere el disulfuro entre esas dos cisteínas, se vería disminuída en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en fase exponencial, sin embargo los análisis de actividad SOD (Fig 4.7) indican que la actividad SOD de Sod1p es mayor en el doble mutante en fase exponencial en YPD y en SC.

4.4 Estudio del Proteoma Global

Como se ha comentado en el apartado anterior, los estudios proteómicos realizados no solo permiten la identificación de proteínas con residuos de cisteínas susceptibles de modificación postraduccional por oxidación de su grupo tiol, sino que también han permitido una detallada caracterización del proteoma completo, identificando variaciones en la cantidad de las proteínas, de las cepas analizadas y en las diferentes condiciones de cultivo y fase de crecimiento. Se detallan a continuación los datos de proteoma global agrupándolos de distintas formas que permiten sacar conclusiones sobre las distintas variables de los experimentos: el tipo de cepa (silvestre o mutante en las tiorredoxinas), y el tipo de medio (SC, YPD o mosto sintético) y fase de crecimiento (exponencial o estacionaria)

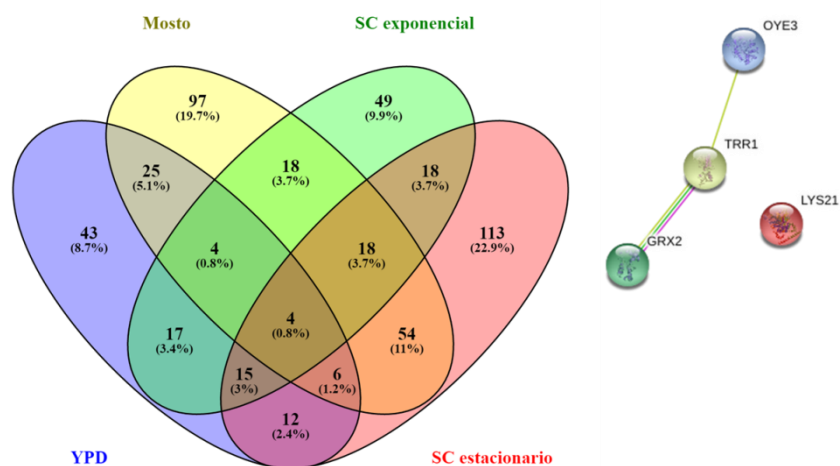
4.4.1 Comparación de proteomas silvestre y mutante *trx1Δtrx2Δ* en las cuatro condiciones de crecimiento

Se analizó el proteoma global en la cepa silvestre industrial haploide C9 y en el doble mutante de las tiorredoxinas *trx1Δtrx2Δ* en los diferentes estados de crecimiento y medios de cultivo. Es importante tener en consideración que, en tres de esas condiciones, la levadura presenta un metabolismo fermentativo de los azúcares, que se encuentran a concentración inicial 2% (de glucosa en YPD y SC exponencial y 20% (de glucosa+fructosa en MS300), mientras que, en la cuarta condición (SC estacionario), la levadura se encuentra en un estado postdiauxico, consumiendo las reservas energéticas de manera respiratoria. El objetivo de este análisis es obtener una visión global de qué proteínas ven modificada su cantidad, directa o indirectamente, por la ausencia de las tiorredoxinas citosólicas en cada condición, con el fin de comprender los fenotipos del mutante observados en dichas condiciones.

Para comparar los datos de abundancia de proteína del análisis del proteoma global se calculó la relación entre la abundancia de una proteína X del doble mutante y la abundancia de la proteína X del silvestre. Se tomaron, como estadísticamente significativos, los valores de factor de incremento (*fold change*) de la relación o ratio de abundancia por debajo de 0.66 y hasta 0 (para las disminuciones en el mutante) y por encima de 1.5 y hasta el máximo (para los aumentos en el mutante). En la Figura 4.11A se muestra un diagrama de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), del ratio de abundancia de cada proteína del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* frente a la cepa silvestre en todos los experimentos realizados. A la derecha se muestra un enriquecimiento realizado por el programa String (<http://string-db.org/>) de aquellas proteínas que son comunes en las cuatro condiciones de estudio, es decir que muestran alteraciones entre el tipo silvestre y el mutante en todas las condiciones. El programa String agrupa por funcionalidad las proteínas de interés observándose que tres de ellas se agrupan en la categoría funcional “respuesta a estrés”: Oye3p, una oxidorreductasa perteneciente a la familia de “Old Yellow Enzymes”, Trr1p, la tiorredoxina reductasa citoplasmática 1, y Grx2p, una glutarredoxina citoplasmática 2.

El programa enriquece también a Lys21p, una isocitrato sintasa. En la Figura 4.10 B se muestra una tabla con cada una de estas proteínas y el ratio de abundancia entre el mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre, en cada una de las condiciones estudiadas.

A



B

	Proteína	YPD exponencial <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt	Mosto MS300 <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt	SC exponencial <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt	SC Estacionario <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt
Grx2p	Glutarredoxina citoplasmática 2	4.04	0.55	2.4	1.023
Lys21p	Isozima Isocitrato sintasa 21	4.64	0.18	3.09	1.57
Oye3p	Oxidorreductasa 3	5.47	1.82	8.6	1.988
Trr1p	Tiorredoxina reductasa	13.9	1.60	6.6	5.13

Figura 4.11 Cuadro resumen del proteoma comparado de la cepa silvestre y del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en las cuatro condiciones de estudiadas. Diagrama de Venn del ratio de abundancia entre la cantidad de proteína del doble mutante y de la cepa silvestre, realizado a través de <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>. A la derecha se muestra el enriquecimiento de las cuatro proteínas que tienen en común los cuatro medios, realizado a través de <http://string-db.org/cgi/network.pl> (A). Cuadro resumen del ratio de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre en las cuatro proteínas comunes a las cuatro condiciones (B).

Como se muestra en la Figura 4.11 B, de las cuatro proteínas comunes, sólo hay dos que se encuentran en una abundancia mayor significativa (≥ 1.5) en los cuatro medios de estudio. Estas proteínas son Trr1p y Oye3p. Como se ha comentado en la introducción, *S. cerevisiae* tiene dos formas generales de protección frente al estrés oxidativo, los mecanismos de detoxificación de ROS y los mecanismos de reparación de daños en macromoléculas. La regulación redox de los grupos tiol de las proteínas superpone ambas formas de protección para mantener el balance redox celular.

Debido a la conexión entre los dos sistemas, cuando la célula carece de uno de ellos, como en este caso de las tiorredoxinas citosólicas, debe activar mecanismos de compensación para hacer frente al estrés oxidativo y para regular la reducción/oxidación de las cisteínas de las proteínas y poder regular la actividad de dichas proteínas (Macierzynska et al., 2007).

La oxidorreductasa 3, Oye3p, es casi el doble de abundante en el mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre tanto en mosto sintético como en fase estacionaria en SC, y llega a ser más de 5 y más de 8 veces más abundante en fase exponencial en YPD y en SC, respectivamente. Es posible que la mayor abundancia de la proteína Oye3p en el doble mutante en todas las condiciones sea uno de esos mecanismos compensatorios ocasionados por la deficiencia de tiorredoxinas, ya que la actividad de estas enzimas se ha relacionado con la modulación de la respuesta a estrés oxidativo y la muerte celular programada (Odat et al., 2007). Aunque también es destacable la diferente abundancia en función de condiciones de cultivo, ese resultado se discutirá más adelante, al establecer la comparación proteómica global de la abundancia de la oxirreductasa relacionada Oye2p (Reekmans et al., 2005), en fase exponencial tanto en SC como en YPD (Figura 4.14).

La segunda proteína que se encuentra en mayor abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en las cuatro condiciones estudiadas es la tiorredoxina reductasa 1, Trr1p. Ya se ha comentado ampliamente en el Capítulo 3 de esta tesis la importancia de Trr1p en la cesión de poder reductor para la actividad de las tiorredoxinas y se ha demostrado que la delección de *TRR1* no es equivalente a la delección de *TRX1* y *TRX2*, sugiriendo que Trr1p tiene otras funciones. Trr1p es 13.9 veces más abundante en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase exponencial en YPD 6.6 veces fase exponencial en SC, 5.13 veces en fase estacionaria en SC veces y 1.6 en mosto sintético. Este aumento en la abundancia de Trr1p en todos los medios puede estar indicando, de nuevo, un mecanismo compensatorio derivado de la necesidad de suplir la ausencia de las tiorredoxinas en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Obviamente, tal estrategia solo tendría sentido fisiológico si existiera un aceptor alternativo del poder reductor de Trr1p, además de las tiorredoxinas. Alternativamente este aumento de la abundancia de Trr1p puede ser una consecuencia aparentemente inútil de los mecanismos de regulación por retroalimentación que inducirían la acumulación de Trr1p ante las señales intracelulares que ocasiona la ausencia de funcionalidad de las tiorredoxinas.

La proteína Lys21p se encuentra en abundancia significativamente mayor en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en todos los medios con 2% de glucosa inicial, YPD exponencial (4.64 veces más), SC exponencial (3.09) y SC estacionario (1.57) pero no en mosto sintético (0.18). Lys21p es una isocitrato sintasa que cataliza la condensación de acetyl-coA y α -ketoglutarato para formar homocitrato que es el primer paso en la biosíntesis de lisina. Este aumento en la abundancia de Lys21p refleja un defecto en el funcionamiento del ciclo de Krebs. El límite de significación elegido (1.5) podría estar colocando artefactualmente al SC estacionario en el grupo de mayor abundancia de la Lys21p. En cuanto a Grx2p, sólo se encuentra significativamente aumentada en los medios con 2% de glucosa en estado exponencial, YPD exponencial y SC exponencial, 4.04 y 2.4 veces más en el doble mutante respectivamente.

Como se ha comentado en la Introducción, las glutarredoxinas son pequeñas proteínas que actúan como oxidorreductasas responsables de la reducción de disulfidos de proteínas o glutatión unido a la proteína (Herrero et al., 2008). En el caso de las glutarredoxinas, a diferencia que las tiorredoxinas, es el glutatión el que actúa como donador de hidrógeno.

A pesar de que Grx2p es citosólica, una parte de ella está localizada en la mitocondria (Porrás et al., 2006). Se ha visto que mientras Grx1p confiere protección frente al anión superóxido e hidropéroxido, Grx2p es especialista en la protección frente hidropéroxidos por lo que no hay tanto solapamiento funcional entre estas dos glutatiorredoxinas ditiólicas. Se ha visto el papel detoxificante de estas proteínas, y a pesar de no tener muchas funciones en común, el cuádruple mutante *trx1Δtrx2Δgrx1Δgrx2Δ* no es viable (Draculic et al., 2000). Esto podría justificar que la ausencia de las tiorredoxinas, haga aumentar, de forma compensatoria, la abundancia de Grx2p en crecimiento exponencial en medios con 2% de la glucosa para hacer frente al estrés oxidativo. Como ya se ha comentado, se ha descrito que en medios de laboratorio la fermentación de la glucosa produce un compuesto tóxico, metilglioxal, formado como subproducto de la glicólisis, cuya detoxificación es dependiente de glutatión, lo que podría activar ese mecanismos aumentando así los niveles de abundancia de Grx2p (Bito et al., 1997). Sin embargo, en condiciones de fermentación en mosto sintético, la relación de abundancia de Grx2p entre el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre disminuye (0.55), si bien las condiciones fermentativas en mosto sintético, un medio mucho más complejo que el YPD o el SC (Riou et al., 1997), son también completamente distintas y la inducción de otros mecanismos e adaptación a estrés, fundamentalmente osmótico, podrían justificar que no sea necesario el aumento de concentración de Grx2p.

4.4.2 Comparación de proteomas silvestre y mutante *trx1Δtrx2Δ* en fase exponencial en medio mínimo completo SC

Debido a las diferencias en la abundancia de las proteínas detectadas en este análisis en diferentes estados de crecimiento en un mismo medio, se decidió estudiar las proteínas detectadas únicamente en fase exponencial en medio mínimo completo. En la siguiente tabla (Tabla 4.2) se muestra el nombre de las proteínas, su descripción, la relación, o ratio de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre y el índice de significatividad (pvalor) de la proteína, se muestra el pvalor en los análisis proteómicos de condiciones individuales. Como en los análisis anteriores, se clasificó a las proteínas en dos categorías según su ratios de abundancia: ratios de 0-0.66 de abundancia y ratio de 1.5 hasta el máximo. Siguiendo esta clasificación, se observan en fase exponencial en SC 14 proteínas en la categoría de menos abundancia en el doble mutante que en la cepa silvestre (ratio 0-0.66), y 17 proteínas de más abundancia en el doble mutante que en la cepa silvestre (ratio superior a 1.5). Se realizó un enriquecimiento a través del programa STRING para estudiar la relación funcional de estas 14 proteínas pero no se obtuvo ninguna categoría sobrerrepresentada.

De las 14 proteínas que se encuentran en menor abundancia, 3 de ellas están relacionadas con la traducción y/o el procesamiento de mRNAs. **Yra1p** es requerida para exportar los mRNA poliadenilados del núcleo, **Lia1p** es esencial para la modificación postraduccional del factor de iniciación eIF5A y **Pab1p** es una proteína de unión a la cola poli(A) del mRNA y regula funciones importantes de la biogénesis del mRNA, de su estabilidad y de su traducción, que además se ha relacionado con la formación de gránulos de estrés en respuesta a carencia de nutrientes (Buchan et al., 2008).

Debido a esta última característica de la proteína Pab1p, se construyó una versión etiquetada con la proteína fluorescente GFP y se introdujo en la cepa silvestre industrial haploide vínica C9 y en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*, para ver el efecto que tenía la ausencia de las tiorredoxinas en la formación de gránulos de estrés en diferentes condiciones. No se vieron diferencias significativas en la formación de gránulos de estrés entre el doble mutante y la cepa silvestre en las condiciones ensayadas de ayuno de nitrógeno y de glucosa (datos no mostrados). Entre las proteínas menos abundantes en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase exponencial en medio SC cabe destacar también, por su importante disminución en el doble mutante, a **Sec6p** que regula el complejo exocítico de vesículas y su fusión con la membrana plasmática, y por último a **Ald4p**, la aldehído deshidrogenasa 4, localizada en la mitocondria y requerida para el crecimiento en etanol.

Tabla 4.2

Nombre	Proteína	SC exponencial	p valor
Yra1p	Proteína de unión a RNA	0.34	0.015
Sec6p	Proteína esencial del complejo exocítico	0.36	0.003
Ald4p	Aldehído deshidrogenasa 4	0.37	0.0066
Lia1p	Deoxipusina hidrolasa	0.43	0.003
Pab1p	Proteína de unión a RNA	0.5	0.022
Ynl247Wp	tRNA sintasa	0.52	0.023
Tpi1p	Triosa fosfato isomerasa	0.52	0.03
Thr1p	Homoserina quinasa	0.54	0.01

Tabla 4.2 Continuación

Nombre	Proteína	SC exponencial	p valor
Rps25Bp	Proteína del ribosoma 40S	0.57	0.034
Eno1p	Enolasa 1	0.58	0.004
Pro2p	Gamma glutamil fosfato reductasa	0.6	0.04
Aim2p	Proteína implicada en la función mitocondrial	0.62	0.0095
Tal1p	Transaldolasa 1	0.62	0.03
Cam1p	Subunidad de eEF1B	0.63	0.023
Rpl10p	Subunidad L10 del ribosoma 60S	1.55	0.014
Hem2p	Aminolevulinato deshidratasa	1.55	0.0091
Rpn5p	Subunidad del proteasoma 26S	1.64	0.0043
Idh1p	Subunidad de la citrato dehidrogenasa	1.66	0.0082
Tub2p	Beta-tubulina	1.72	0.0005
Gag-pol PE	Probable RNA polimerasa	1.73	0.03
Scl1p	Subunidad del proteasoma 20S	1.74	0.002
Ade5,7p	Proteína bifuncional de biosíntesis de purinas	1.91	0.0095
Car1p	Arginasa	2.04	0.0086
Pst2p	Secretora Protoplastos	2.15	0.011
Tpm2p	Tropomiosina	2.18	0.014

Tabla 4.2 Continuación

Nombre	Proteína	SC exponencial	p valor
Aro2p	Flavin reductasa	2.76	0.04
Tub1p	Alfa-tubulina	3.22	0.0006
Fpr3p	Isomerasa	3.55	0.03
Erg6p	Metiltransferasa	3.58	0.04
Rgi1p	Sin función conocida Relacionada con metabolismo respiratorio	7.19	0.033
Ty1Bp	Retrotransposón	9	0.03

Tabla 4.2 Proteínas con abundancia diferencial en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en la cepa silvestre en fase exponencial en medio mínimo completo SC. Se muestra el nombre de la proteína, su definición y su relación, o ratio, de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre y el valor de significatividad.

Se realizó un enriquecimiento de las proteínas únicas en SC exponencial cuya abundancia en el doble mutante con respecto al silvestre es de **1,5 veces o más**. Son 17 las proteínas detectadas. Se realizó enriquecimiento a través del programa STRING de estas 17 proteínas sin detectar una funcionalidad común. Entre las 17 proteínas con mayor abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* se comenta a continuación la función de las más abundantes, **Car1p** es una arginasa responsable de la degradación de arginina cuya expresión se reprime en presencia de este aminoácido y vía NCR. **Pst2p** se induce en estrés oxidativo a través de Yap1p. **Tpm2p** es una tropomiosina, que une y estabiliza los filamentos de actina, por lo que tiene funciones relacionadas con el crecimiento polarizado y con la distribución de los orgánulos. **Aro2p** es una enzima bifuncional con actividad flavin reductasa y corismato sintasa que regula la síntesis de aminoácidos aromáticos. **Tub1p** es una α -tubulina constituyente de los microtúbulos, por lo que esta relacionada con el crecimiento y división celular. **Fpr3p** es una cis-trans peptidil-prolil isomerasa vacuolar podría estar relacionada con el ensamblaje y plegamiento de proteínas ribosomales. **Erg6p** es una metiltransferasa implicada en la biosíntesis de ergosterol. **Rgi1p** es una proteína de función desconocida que está relacionada con el metabolismo energético bajo condiciones respiratorias y que se acumula en deficiencia de hierro.

Finalmente, **Ty1Bp** es una proteína forma foci citoplasmáticos en estrés replicativo, codificada por **YAR009C**, un retrotransposon de origen viral que incluye los genes Gag (precursor de proteína de cubierta) y Pol (precursor de la proteasa, la transcriptasa reversa y la integrasa). Como se puede observar en la Tabla 4.2, entre las proteínas que se expresan más en el doble mutante que en la cepa silvestre abundan actividades implicadas en la división celular. El doble mutante tiene un defecto en la división celular ya que tiene una fase S del ciclo celular prolongada (Muller, 1991), lo que podría explicar el aumento en fase exponencial de proteínas relacionadas, como Tpm2p (2.18 veces más abundante en el doble mutante que en la cepa silvestre), Tub1p (3.22), Frp3p (3.55), Erg6p (3.58), Rg1p (7.19) y Ty1Bp (9). A pesar del aumento en la abundancia de todas estas proteínas, el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* no consigue suplir los defectos de crecimiento y división y tiene una viabilidad inferior a la de la cepa silvestre (Figura 4.3).

4.4.3 Comparación de proteomas silvestre y mutante *trx1Δtrx2Δ* en fase estacionaria en medio mínimo completo SC

En la Tabla 4.3 se recoge la extensa lista de proteínas con variación significativa en la relación de abundancia entre el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre que resultan exclusivas de la fase estacionaria en medio SC. 134 proteínas se encuentran significativamente en menor abundancia en el doble mutante que en la cepa silvestre por lo que se realizó un enriquecimiento funcional con el programa String que mostró, como grupos funcionales enriquecidos, la biosíntesis de bases nitrogenadas y nucleótidos y la biosíntesis de aminoácidos. Estos resultados sugieren que en fase estacionaria en medio SC, sin crecimiento celular y sin nutrientes, el doble mutante de las tiorredoxinas tiene un déficit en estas proteínas que podría explicar el fenotipo de reducida LC en este medio y esta fase de crecimiento.

Son doce proteínas las que se encuentran en mayor abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase estacionaria en medio SC. La proteína que se encuentra en mayor abundancia es **Sno4p**, con una relación de abundancia de 82.98. Se ha descrito el papel de Sno4p como una posible chaperona y proteasa requerida para la reprogramación transcripcional del cambio diauxico y para la supervivencia en fase estacionaria, así como fenotipos mutantes de sensibilidad a estrés oxidativo y mayor acumulación de ROS y de longevidad y autofagia disminuidas (Skoneczna et al., 2007; Miller-fleming et al., 2014). Esta proteína está inducida bajo el estrés por choque térmico o la privación de cobre. Sno4p es una proteína perteneciente a la familia DJ-I donde se encuentran las proteínas Hsp31p, Hsp32p y Hsp34p. Estas cuatro proteínas presentan la misma estructura y función siendo Hsp31p la más estudiada. Esta proteína se ha visto relacionada en la protección frente a las especies reactivas del oxígeno cuya expresión está inducida bajo estrés oxidativo en una manera dependiente de Yap1p. Se ha descrito que el nivel de Hsp31p es más alto en la fase postdiauxica que en la logarítmica.

Durante el cambio diaúxico las células cambian de la utilización a través de la fermentación de la glucosa a la utilización por oxidación del etanol. Dma2p es una E3 ubiquitin ligasa, 28.33 veces más abundante en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase estacionaria en medio SC. Isd11p es 27.7 veces más abundante en el doble mutante, y es un activador de la cisteína desulfurasa Nfs1p, requerida para la biosíntesis de clusters hierro-azufre mitocondriales. La proteína **Yrb1p** es 2.43 veces más abundante en el doble y es una proteína de unión a la GTPasa Ran implicada en el importe de proteínas nucleares y exporte de RNA.

Destacar también la mayor abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase estacionaria en medio SC de la citocromo sintasa 2, **Cit2p**, una isoenzima relacionada con el ciclo del glioxilato que cataliza la condensación del acetyl coenzima A y oxaloacetato para formar citrato. Su expresión está controlada por los factores transcripcionales de la ruta de respuesta retrógrada, Rtg1/3p.

Tabla 4.3

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Hht1p	Histona H3	0.006	0.000001
Crn1p	Carioferina	0.007	0.04
Mtc2p	Proteína de función desconocida	0.04	0.000016
Spg4p	Proteína de fase estacionaria necesaria para la supervivencia a altas temperaturas	0.044	0.01
Hfd1p	Deshidrogenasa del metabolismo de esfingolípidos	0.077	0.0011
Mge1p	Cochaperona mitocondrial	0.083	0.03

Tabla 4.3. Continuación

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Atp14p	Subunidad de la ATP sintasa mitocondrial	0.09	0.023
Qcr10p	Subunidad de la citocromo c oxidoreductasa	0.09	0.0000003
Atp7p	Subunidad de la ATP sintasa mitocondrial	0.12	0.005
Tkl2p	Transcetolasa	0.12	0.0000001
Ilv3p	Dihidroxiacido deshidratasa de la biosíntesis de aminoácidos ramificados	0.14	0.0085
Ssa3p	ATPasa de respuesta a estrés	0.14	0.0000002
Nqm1p	Transaldolasa	0.15	0.0072
Chc1p	Clatrina	0.15	0.0011
Msc1p	Proteína de función desconocida relacionada con la recombinación meiótica	0.16	0.0002
Mrp8p	Proteína de función desconocida. Su transcripción se induce bajo estrés de membrana	0.16	0.00004
Sol4p	6 fosfogluconolactonasa	0.16	0.015
Tma7p	Proteína de función asociada con ribosomas	0.16	0.02

Tabla 4.3. Continuación

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Mic60p	Componente del complejo mitocondrial MICOS	0.16	0.0033
Rtn2p	Proteína del reticulón	0.17	0.00001
Yhr138Cp	Proteína de función desconocida	0.166	0.03
Fdc1p	Descarboxilasa	0.17	0.034
Ape3p	Aminopeptidasa vacuolar	0.17	0.0016
Yhm2p	Proteína antiportadora de oxoglutarato y citrato	0.2	0.03
Bdh1p	Butandiol deshidrogenasa dependiente de NAD	0.21	0.0033
Hsp42p	Chaperona de choque térmico	0.21	0.02
Ysa1p	ADP-ribosa pirofosfatasa	0.22	0.0013
Ede1p	Proteína implicada en la formación de sitios endocíticos	0.25	0.0017
Gfa1p	Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa en biosíntesis de quitina	0.27	0.008
Fun12p	eIF5B factor de iniciación de la traducción	0.27	0.004

Tabla 4.3 Continuación

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Arc40p	Subunidad del complejo ARP2/3	0.27	0.015
Cyt1p	Citocromo C 1	0.27	0.0003
Hbt1p	Proteína del nódulo (shmoo) de conjugación	0.27	0.002
Ydl086Wp	Posible carboximetilenobutenolidasa	0.28	0.007
Gvp36p	Proteína de la membrana del Golgi	0.28	0.02
Clc1p	Clatrina	0.29	0.014
Gad1p	Glutamato descarboxilasa	0.29	0.003
Kap123p	Beta-carioferina	0.29	0.0087
Sec13p	Proteína de la ruta de secreción	0.3	0.00065
Cdc33p	Factor de iniciación de la traducción eIF4E	0.3	0.016
Glc3p	Enzima implicada en la acumulación de glucógeno	0.31	0.002
Pub1p	Proteína de unión a RNA	0.32	0.003
Pma2p	H ⁺ -ATPasa de membrana	0.32	0.0015
Gph1p	Glucógeno fosforilasa	0.32	0.000003

Tabla 4.3 Continuación

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Wtm1p	Modulador transcripcional del gen de la ribonucleotio reductasa	0.34	0.014
Scs2p	Regulador del metabolismo de fosfolípidos	0.34	0.01
Gln1p	Glutamina sintetasa	0.34	0.009
YMR090Wp	Proteína citoplasmática de función desconocida	0.34	0.0017
YDL124Wp	Alfa-cetoamida reductasa NADPH dependiente	0.35	0.00098
Pai3p	Inhibidor de la proteinasa A	0.35	0.04
Rpb10p	Subunidad de las RNA polimerasas I, II y III	0.35	0.03
Cdc48p	AAA-ATPasa	0.36	0.0004
Aim17p	Proteína de función desconocida	0.36	0.001
Sds22p	Subunidad reguladora de la fosfatasa tipo I	0.36	0.0096
Ded81p	Aminoacil-tRNA sintetasa	0.39	0.004
Uga1p	GABA transaminasa	0.39	0.001
Glo1p	Glioxilasa monomérica	0.4	0.026
Om45p	Proteína mitocondrial de función desconocida	0.41	0.0002
Pep4p	Proteinasa A	0.42	0.018

Tabla 4.3 Continuación

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Tma19p	Proteína asociada a ribosomas	0.42	0.00002
Ygr201Cp	Proteína con función desconocida	0.44	0.016
Idp1p	Isocitrato deshidrogenasa mitocondrial	0.46	0.023
Ade1p	Biosíntesis de nucleótidos de purina	0.47	0.00023
Atp16p	ATP sintasa mitocondrial	0.48	0.0026
Qcr7p	Citocromo C oxidasa.	0.52	0.03
Pda1p	Subunidad E1 α de la piruvato deshidrogenasa	0.52	0.03
Yro2p	Proteína con papel en la respuesta a estrés por pH ácido	0.52	0.003
Vma8p	Subunidad de la ATPasa vacuolar	1.47	0.0043
Ybr139Wp	Posible serin carboxipeptidasa	1.55	0.000016
Cit2p	Citrato sintasa	1.59	0.00007
Cyb2p	Citocromo b2	1.61	0.0042
Cit1p	Citrato sintasa	1.71	0.00085
Ymr31p	Subunidad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa mitocondrial	1.72	0.005
Met5p	Subunidad de la sulfito reductasa	1.74	0.0024

Tabla 4.3 Continuación

Nombre	proteína	SC estacionario	P valor
Asn2p	Asparagina sintetasa	1.98	0.003
Yrb1p	Proteína de unión a la GTPasa RAN	2.43	0.00001
Isd11p	Activador de la cisteína desulfurasa, Nfs1p	27.7	0.028
Dma2p	Ubiquitín ligasa E3	28.33	0.00011
Sno4p	Posible chaperona y cistein proteasa	82.98	0.0012

Tabla 4.3 Proteínas con abundancia diferencial en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en la cepa silvestre en fase exponencial y estacionaria en medio mínimo completo SC. Se muestra el nombre de la proteína, su definición y su relación, o ratio, de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre.

4.4.4 Comparación de proteomas silvestre y mutante *trx1Δtrx2Δ* en condiciones de envejecimiento cronológico

En la Tabla 4.4 se muestra el listado de las proteínas con abundancia diferencial únicas en medio mínimo completo SC respecto a las otras condiciones, condiciones coincidentes con las de los ensayos de envejecimiento cronológico (apartado 2.2.3 de Materiales y Métodos). Como en las tablas anteriores, se indica la proteína, su descripción y la relación, o ratio, de abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* respecto de la cepa silvestre, y en las dos fases de crecimiento, exponencial y estacionaria.

Se puede observar una única proteína con ratio de abundancia menor en la fase exponencial que en la fase estacionaria **Inh1p**, que es un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial que produce ATP utilizando el gradiente de protones de la membrana mitocondria interna generado por los complejos transportadores de electrones de la cadena respiratoria. Las ATPasas tipo F tienen 2 dominios estructurales, F1 es el núcleo catalítico extramembrana y F0 es el canal de protones de la membrana. La abundancia disminuida de Inh1p sugiere la necesidad de activación de la síntesis de ATP en el doble mutante en fase exponencial.

Resultados y Discusión

Nombre	proteína	SC exponencial <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	SC Estacionario <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>
Inh1p	Proteína que inhibe la síntesis de ATP	0.52	1.27
Pre8p	Subunidad del proteasoma 20S	1.18	0.011
Met17p	O-acetil homoserina O- acetil serina sulfidrasa	1.59	2.3
Mxr1p	Metionina reductasa	2	0.36
Adh3p	Alcohol deshidrogenasa	1.9	1.28
Sfa1p	Alcohol y formaldehído deshidrogenasa	2	1
Gpd1p	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa	2.16	0.2
Cys3p	Cistation gamma liasa	2.21	1.22
Sod2p	Superóxido Dismutasa 2	4.5	2.35
Atp3p	ATP sintasa	51	0.46

Tabla 4.4 Proteínas con abundancia diferencial en el doble mutante *trx1Δ trx2Δ* y en la cepa silvestre en fase exponencial y estacionaria en medio mínimo completo SC. Se muestra el nombre de la proteína, su definición y su relación, o ratio, de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre.

Son 7 las proteínas que están en mayor abundancia en el mutante en fase exponencial que en estacionaria. **Mxr1p** es una metionina S sulfoxido reductasa que está implicada en respuesta a estrés oxidativo protegiendo a los *clusters* hierro-azufre y relacionada con la longevidad. **Sfa1p** es una alcohol y aldehído deshidrogenasa cuyo aumento en el medio SC exponencial en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* podría estar relacionado con deficiencias en la ruta de fermentativa.

Otra proteína que se encuentran en mayor abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en fase exponencial es la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente, Gpd1p, una enzima clave en la biosíntesis del glicerol y esencial para el crecimiento en condiciones de estrés osmótico. Cys3p es una cistation gamma liasa que se acumula en respuesta al estrés replicativo. Como se ha comentado, el mutante *trx1Δtrx2Δ* tiene un defecto en la síntesis de dNTPS y una fase S del ciclo celular prolongada (Muller, 1991) lo que generaría estrés replicativo y justificará el aumento de abundancia de proteínas como Cys3p.

Sod2p es 4.5 veces más abundante en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase exponencial en SC y, aunque sigue siendo más abundante en fase estacionaria, su relación de abundancia se reduce a la mitad. Como ya se ha comentado, Sod2p es una superóxido dismutasa dependiente de manganeso, mitocondrial y que protege frente a las ROS destruyendo radicales superóxido y cuya acumulación puede verse aumentada como mecanismo compensatorio por la ausencia de tiorredoxinas. Finalmente, Atp3p forma parte del componente F1 de la ATP sintasa mitocondrial y 51 veces más abundante en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en fase exponencial lo que resulta consistente con la disminución de la abundancia de la proteína inhibidora de la ATP sintasa Inh1p, ya comentada, y sugiere la ineficiencia de los mecanismos de síntesis de ATP acoplada a la vía glicolítica y la necesidad de recurrir a la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. En fase exponencial en medio SC la glucosa es fermentada y el efecto Crabtree bloquea la respiración, lo que en condiciones de aireación podría generar ROS y estrés oxidativo en ausencia de las tiorredoxinas. Por otra parte, se ha descrito que las mutaciones en ATP1 y ATP3 afectan al crecimiento de manera diferente en función de que el medio de cultivo sea fermentativo o respiratorio (Francis et al., 2007), de manera que los mutantes en estos genes crecen menos en medio de cultivo respirable, donde se requiere la fosforilación oxidativa, mientras que no presentan defectos en medio fermentable donde no ocurre la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa.

El doble mutante aumenta la cantidad, en fase exponencial, de proteínas que están relacionadas con el metabolismo fermentativo, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, Sfa1p que tiene un papel en el metabolismo fermentativo y en degradación de compuestos tóxicos como el formaldehído. Estos datos demuestran que en ausencia de las tiorredoxinas citosólicas y en un metabolismo fermentativo, la célula produce más abundancia de proteínas para contrarrestar esta deficiencia energética en la producción de ATP necesario para la célula así como en la eliminación de compuestos tóxicos y para proteger frente a los diferentes tipos de estrés que suceden durante el crecimiento y la división celular.

Como se ha comentado durante toda la tesis, el crecimiento en medio de envejecimiento en SC tiene varias fases, una fase de crecimiento exponencial fermentativo que dura entre 12 y 24 h, en función de la cepa, seguida de un cambio diáuxico cuando se ha consumido la glucosa para pasar a un metabolismo respiratorio del etanol producido, y una fase estacionaria de no división en la que células sobreviven con las reservas acumuladas, para finalmente entrar en la fase de muerte celular. El análisis de abundancia de proteínas permite también concluir que las proteínas relacionadas con la biosíntesis de amino ácidos como cisteína y grupos sulfuro se encuentran aumentadas en el doble mutante respecto de la cepa silvestre y en fase exponencial. Esto podría relacionarse por el daño oxidativo en los centros Fe-S susceptibles de oxidación que explicarían este aumento en los grupos sulfuro como una manera compensatoria de proveer componentes clave de los centros activos de proteínas.

4.4.5 Comparación de proteomas silvestre y mutante *trx1Δtrx2Δ* en fase exponencial en medios con 2% de glucosa

Continuando con el estudio proteómico global, se analizan a continuación las proteínas comunes en fase exponencial entre los medios YPD y SC, con el mismo porcentaje inicial de glucosa, 2%, resultados que se muestran en la Tabla 4.5. Como en apartados anteriores, se representa las proteínas comunes en ambos medios, su descripción y su relación de abundancia entre el doble *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre. En la Figura 4.12 se representan las relaciones entre las proteínas obtenidas en el enriquecimiento funcional. La mayor parte de las proteínas enriquecidas son proteínas de respuesta a estrés, y muchas relacionadas con la asimilación y procesamiento de la glucosa.

Nombre	Descripción	SC exponencial <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt	YPD Exponencial <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt
Ura3p	orotidina 5- fosfato descarboxilasa, síntesis de uracilo	0.58	0.56
Zwf1p	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1.74	3.95
Tsa1p	Peroxirredoxina reductasa	2.11	7.08
Glr1p	Glutación oxidoreductasa	1.41	0.15
Sod1p	Superóxido dismutasa	2.14	4.28
Rnr1p	Ribonucleótido reductasa	3.11	3.64
Lys20p	Homocitrato sintasa	3.13	5.84
Icl1p	Isocitrato liasa	3.3	6.6
Aco2p	Aconitasa 2	3.38	6.37
Ddr48p	Proteína de respuesta a daño en el DNA	12.5	257.83
Srx1p	Sulfirredoxina 1	32.2	14.16

Tabla 4.5 Proteínas con abundancia diferencial en el doble mutante *trx1Δ trx2Δ* y en la cepa silvestre en fase exponencial en medio mínimo completo SC y en YPD. Se muestra el nombre de la proteína, su definición y su relación, o ratio, de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre en ambos medios.

Tal y como se describe en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos, además de 2% de glucosa el medio rico YPD está compuesto por 1% de extracto de levadura y 2% de peptona mientras que el medio mínimo completo SC, contiene 0.17% de base nitrogenada, 0.5% de sulfato de amonio y una mezcla de aminoácidos 0.2%. De manera que, a pesar de tener 2% de glucosa, difieren en muchos otros compuestos.

Son seis las proteínas que resultan enriquecidas como grupo funcional de respuesta a estrés oxidativo: Zwf1p, Tsa1p, Glr1p, Srx1p y Sod1p. De estas seis proteínas, sólo Glr1p, se encuentra en menor abundancia en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre y esta diferencia es significativa sólo en fase exponencial en medio YPD. Las otras cuatro proteínas se encuentran en mayor abundancia en el doble mutante en los dos medios a comparar.

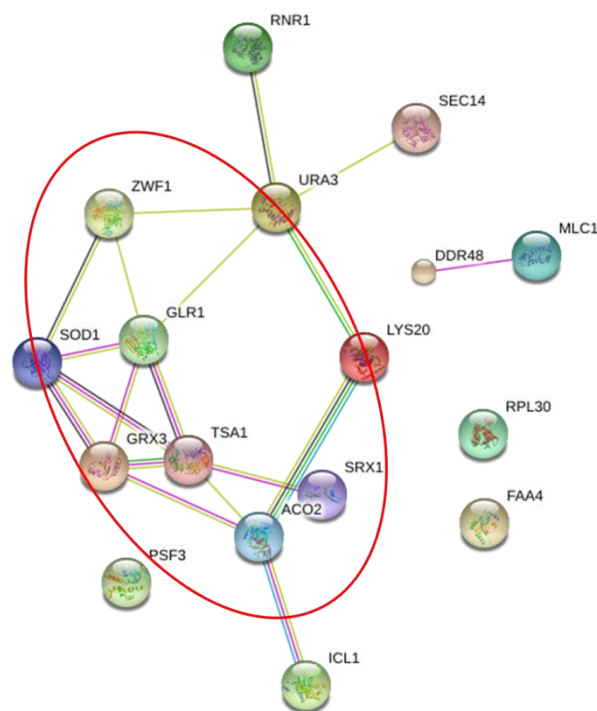


Figura 4.12 Enriquecimiento de las proteínas comunes en fase exponencial en los medios de crecimiento con metabolismo fermentativo en 2% de glucosa.

De estas 6 proteínas cabe destacar la proteína **Tsa1p**. Como hemos comentado y discutido en el Capítulo 2, Tsa1p juega un papel muy importante en la defensa frente al estrés oxidativo y también como chaperona y en la respuesta a la disponibilidad de nutrientes, además de sus conexiones con la ruta de control general de aminoácidos y con la represión por glucosa y, por lo tanto, con la respiración. Como se puede observar en la Tabla 4.5, el ratio de abundancia de Tsa1p en el doble mutante respecto de la cepa silvestre en fase exponencial en SC es de 2.11 y en YPD es de 7.08. En ambos medios, hay mayor cantidad de Tsa1p en el doble mutante de las tiorredoxinas.

Debido a que Tsa1p forma agregados en respuesta a estrés y que estos agregados colocalizan con la proteína desagregasa Hsp104p en presencia de proteínas mal plegadas por el compuesto AZC (2.2.5.2.4 de Materiales y Métodos) y no por cicloheximida (Weids and Grant, 2014), se estudió mediante la proteína de fusión Tsa1-GFP la formación de agregados en el doble mutante en diferentes condiciones de estrés: estrés oxidativo por H₂O₂ 0.6mM durante 30 minutos y estrés por agregación de proteínas con el compuesto AZC 5mM durante 2 horas en fase exponencial en medio SD. Los resultados se muestran en la Figura 4.13.

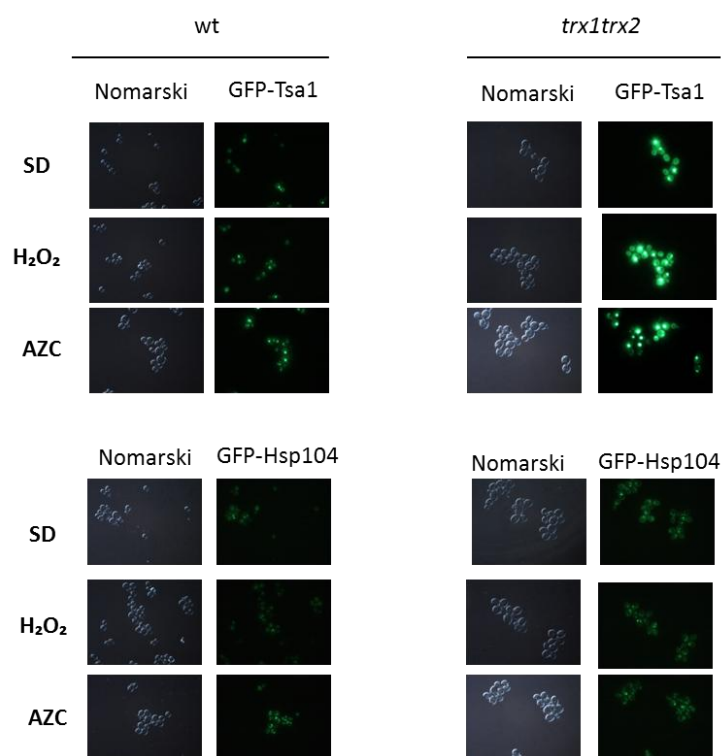


Figura 4.13 Agregación de la proteína Tsa1p en condiciones de estrés oxidativo y de estrés por parada en la traducción en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Se utilizó el microscopio Nikon 90i tal y como se describe en el apartado 6 de Materiales y Métodos para el estudio de la agregación de Tsa1p en condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂ (0.6mM) y estrés por agregación de proteínas con el compuesto AZC (5mM) en la cepa silvestre y en el doble mutante de las tiorredoxinas. Se utilizó la agregación de la proteína Hsp104p como control.

Tanto en presencia de estrés oxidativo por H₂O₂ como de estrés por agregación de proteínas por AZC, hay una mayor fluorescencia en el doble mutante que en la cepa silvestre. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los niveles de proteína Tsa1p en el estudio proteómico. No obstante no se observa ninguna variación en su agregación. Se ha descrito el papel protector de las tiorredoxinas citosólicas frente a condiciones reductoras (como presencia de ditiotreitól que induce la respuesta de proteínas mal plegadas UPR).

Este papel opera a través de la actividad chaperona de Tsa1p, lo cual podría prevenir la agregación de proteínas ribosomales mal plegadas ocasionadas bajo un estrés reductivo (Rand and Grant, 2006b). Además el estado redox de Tsa1p es mantenido por el sistema tiorredoxina y se ha visto que en los mutantes *trx1Δtrx2Δ* y *trr1Δ* los niveles proteicos de Tsa1p son altos debido a la activación constitutiva del factor de transcripción Yap1p (Trotter et al., 2008), como se ha discutido en el capítulo anterior mediante la detección de los niveles de Tsa1p en el mutante *trr1Δ* por western blot, Figura 3.3. Los resultados obtenidos por microscopía y los resultados obtenidos en el proteoma concuerdan con la bibliografía, la ausencia de las tiorredoxinas aumenta los niveles de proteína Tsa1p. Se realizó el mismo experimento pero utilizando la fusión Hsp104p-GFP ya que, como se ha mencionado anteriormente, Hsp104p es una desagregasa que colocaliza con Tsa1p bajo estrés por AZC. En la Figura 4.13 se observa que no hay diferencias de agregación de Hsp104p entre la cepa silvestre y el mutante *trx1Δtrx2Δ*.

La sulfirredoxina **Srx1p** también es más abundante en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en la cepa silvestre en fase exponencial tanto en SC como en YPD. Como ya se ha mencionado, Srx1p es una sulfirredoxina citoplasmática que contribuye a la defensa frente al estrés oxidativo reduciendo los grupos sulfínicos de las cisteínas de Tsa1p cuando ha sido expuesta a estrés oxidativo (Biteau et al., 2003). Como se observa en la Tabla 4.5 los valores de abundancia de Srx1p en el doble mutante frente a la cepa silvestre son significativamente altos, 32 veces más en medio SC y 14.16 veces en YPD. Como hemos comentado en el caso de Tsa1p, en el doble mutante de las tiorredoxinas hay un incremento en los niveles de Tsa1p y una mayor oxidación de Tsa1p. Esto justificaría el aumento de los niveles de sulfirredoxina para reducir las cisteínas oxidadas de Tsa1p.

Al igual que Tsa1p y Srx1, que están downstream de las tiorredoxinas en el flujo redox, resulta interesante la activación de la ruta de los fosfatos de pentosa que proporciona poder reductor en forma de NADPH, y cuya primera etapa esta catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa Zwf1p. Destaca también en este análisis la presencia de la ribonucleótido reductasa, **Rnr1p**, que es 3.11 veces más abundante en el doble mutante en SC y 3.64 veces en YPD, confirmando de nuevo la necesidad del doble mutante de suplir las carencias de la síntesis de dNTPs aumentando los niveles de enzima que los produce, en momentos donde es importante la síntesis de dNTPs como es durante la división celular en fase exponencial.

Los niveles de **Sod1p**, la superóxido dismutasa 1, se encuentran incrementados en el doble mutante tanto en SC (2.14 veces) como en YPD (4.28 vces), probablemente inducida su síntesis debido a los efectos redox causados por la ausencia de las tiorredoxinas.

Otras proteínas a destacar son las de biosíntesis de lisina, **aconitasa 2** y **homocitrato sintasa** que son 3.38 y 3.13 veces más abundantes en fase exponencial en SC y 6.37 y 5.84 veces más abundantes en fase exponencial en YPD. Como se discutirá más adelante, en el estudio metabolómico se observa un incremento en los niveles de lisina en el doble mutante (Figura 4.30). Por último, **Ddr48p**, es una proteína cuya expresión aumenta bajo estrés por choque térmico o por tratamientos que producen daño en el DNA. Esta proteína es 12.5 veces más abundante en el doble mutante en fase exponencial en SC y 257.83 veces en YPD.

Este dato podría reflejar un importante daño en el DNA en el doble mutante en estas condiciones de crecimiento. Debido a que durante el crecimiento fermentativo de la glucosa se producen compuestos tóxicos, como el metilglioxal, y a que durante el crecimiento es necesaria la síntesis de dNTPs y de DNA para la división celular así como la protección frente a diferentes tipos de estrés, el doble mutante de las tiorredoxinas aumenta los niveles de aquellas proteínas que son necesarias en cada momento para evitar el daño celular. Solo la proteína Ura3p, implicada en la biosíntesis de uracilo, presenta niveles reducidos de proteína en el doble mutante en las dos condiciones. Esto puede contribuir a una menor tasa de crecimiento.

4.4.6 Estudio del proteoma y del metaboloma comparados del mutante *trx1Δtrx2Δ* y de la cepa silvestre en mosto sintético

El estudio de la abundancia de proteínas detectadas en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en la cepa silvestre durante el crecimiento en mosto sintético así como el estudio del metaboloma en las mismas condiciones de crecimiento en la cepa silvestre y en el doble mutante, permitirá obtener más información del papel de las tiorredoxinas en este medio y relacionarlo con la extensión de la longevidad que el doble mutante presenta en estas condiciones de crecimiento (Figuras 4.4 y 4.5). En este apartado se detallan las proteínas detectadas diferencialmente en el análisis del proteoma en mosto sintético que presentan diferencias de abundancia entre el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre, que se recogen en la Tabla 4.6 ordenadas de menor a mayor relación de abundancia. 73 de las proteínas tienen un ratio de abundancia entre el doble mutante y el silvestre menor de 0.66 y sólo 8 proteínas son más abundantes en el doble mutante.

Se realizó un estudio de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en todas las proteínas cuya abundancia en el doble mutante frente al silvestre era menor de 0.66. Se observó un gran número de proteínas ribosomales (Rpl y Rps), lo que es consistente con el defecto de crecimiento del doble mutante y con su mayor tolerancia a cicloheximida. Otras categorías incluyen las 20 proteínas enriquecidas relacionadas con la unión de ribonucleótidos de purina, así como 7 relacionadas con la biosíntesis de aminoacil tRNAs y otras relacionadas con rutas metabólicas, como el metabolismo de las hexosas. De este grupo de proteínas, destacan las ácido graso sintetas Fas1p y Fas2p, que se discutirán más adelante en este apartado.

Esta visión global de la abundancia de proteínas en mosto sintético del doble mutante frente al silvestre, permite clasificar 3 procesos celulares importantes que se encuentran afectados en ausencia de las tiorredoxinas citoplasmáticas. Uno de ellos es la traducción, observándose menor abundancia de proteínas relacionadas con el proceso de síntesis de proteínas. Otro proceso es la biosíntesis de ácidos grasos y el tercero es metabolismo de hexosas y de asimilación de sulfuro, que se irán detallando y discutiendo a lo largo de este apartado.

Nueve son las proteínas cuya abundancia en el doble mutante es más de 1,5 veces que en el silvestre (Tabla 4.6). La proteína con una relación, o ratio, de abundancia más alterada es **Mir1p**, que es 300 veces más abundante en el doble mutante. Es un transportador de fosfato mitocondrial que importa fosfato inorgánico a la mitocondria. Relacionada con esta, se observa también **Cor1p**, ratio 7.09, una subunidad del complejo ubiquinol citocromo c reductasa, componente de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna. La segunda proteína con mayor ratio de abundancia es **Met14p**, 55.16, una adenilil sulfato quinasa requerida para la asimilación del azufre e implicada en el metabolismo de la metionina. Como se puede ver en la Tabla 4.6, la proteína **Hsp30p**, inhibidor de la H⁺-ATPasa Pma1p, es 7.08 veces más abundante en el doble mutante que en la cepa silvestre, mientras que Hsp31p está 0.14. Estas proteínas junto con Sno4p, que se ha discutido anteriormente (83 veces más abundante en el doble mutante en SC estacionario, Tabla 4.2), pertenecen a la misma familia de reguladores de la H⁺-ATPasa.

Ole1p es 4.1 veces más abundante. Es la única desaturasa de ácidos grasos que tiene *S.cerevisiae*. **Aro9p** es una aminotransferasa que cataliza el primer paso del catabolismo de aminoácidos aromáticos triptófano, fenilalanina y tirosina y es 4.34 veces más abundante en el doble mutante que en la cepa silvestre. **Prc1p** es una carbopeptidasa vacuolar implicada en la degradación in específica de pequeñas proteínas que es 22.31 veces más abundante en el doble mutante.

Tabla 4.6

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt	p valor
Arg7p	Ornitina acetiltransferasa mitocondrial	0.0044	0.022
Yhr112Cp	Proteína con función desconocida	0.039	0.0027
Ils1p	Isoleucil-tRNA sintetasa	0.043	0.00087
Ths1p	Treonin-tRNA sintetasa	0.074	0.00017
Tys1p	Tirosil-tRNA sintetasa	0.078	0.04
Plb1p	Fosfolipasa B	0.08	0.011

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	pvalor
Imd3p	Inosina monofosfato deshidrogenasa	0.093	0.031
Adh6p	Alcohol deshidrogenasa	0.101	0.07
His4p	Fosforibosil ATP pirofosfatasa	0.116	0.0001
Ecm29p	Proteína del proteasoma	0.117	0.0055
Yhr020Wp	Prolil-tRNA transferasa	0.117	0.0017
Irc15p	Proteína asociada a microtúbulos	0.121	0.017
Hsp31p	Metilglioxilasa	0.14	0.017
Rpl19Ap	Proteína L19 de la subunidad 60S del ribosoma	0.14	0.0067
Asn1p	Asparagina sintetasa	0.14	0.036
Grx1p	Glutación oxidorreductasa	0.15	0.037
Sis1p	Cochaperona HSP40 tipo II	0.15	0.0024
Rpl32p	Proteína L32 de la subunidad 60s del ribosoma	0.15	0.011
Tif6p	Proteína que podría estar implicada en la biogénesis de ribosomas	0.16	0.0056
Aro4p	3-deoxi-D-arabinoheptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa	0.16	0.0006

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	pvalor
Rps18Bp	Proteína de la subunidad 40S del ribosoma	0.17	0.034
Rpl35Ap	Proteína L35 de la subunidad 60S del ribosoma	0.18	0.011
Rpl36Ap	Proteína L36A de la subunidad 60S ribosomal	0.18	0.01
Ynl208Wp	Proteína de función desconocida que interactúa con ribosomas	0.18	0.0011
Dpm1p	Dolicol-fosfomanosa sintasa de la membrana del RE	0.19	0.026
Rpl4Ap	Proteína L4A de la subunidad 60S del ribosoma	0.2	0.00004
Ham1p	Nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa	0.21	0.00085
Ade6p	Formilglicinamida-ribonucleótido sintetasa	0.21	0.038
Dug1p	Cis-gli-metalo dipeptidasa	0.22	0.0089
Rpl39p	Proteína L39 de la subunidad 60 S del ribosoma	0.22	0.011
Sam2p	S-adenosilmetionina sintetasa	0.22	0.0031
Ade17p	Enzima de la biosíntesis de novo de purinas	0.23	0.0025

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	pvalor
Rpl29p	Proteína L29 de la subunidad 60S del ribosoma	0.24	0.0018
Rpl40Bp	Proteína L40B de la subunidad 60S del ribosoma	0.24	0.0053
Mae1p	Enzima málica mitocondrial	0.26	0.0088
Ado1p	Adenosina quinasa 1	0.26	0.005
Rps9Bp	Proteína 9B de la subunidad 60S del ribosoma	0.27	0.00087
Ino1p	Inositol 3 fosfato sintasa	0.27	0.02
Rps21Ap	Proteína componente de la subunidad 60S del ribosoma	0.28	0.019
Aro3p	DAHP sintasa	0.28	0.0008
Gpm1p	Fosfoglicerato mutasa	0.28	0.02
Rib3p	DHBP sintasa	0.29	0.0009
Fas1p	Ácido graso sintetasa	0.29	0.015
Pdc1p	Piruvato descarboxilasa	0.3	0.002
Ilv6p	Acetolactato sintasa	0.3	0.007
Anb1p	Factor de elongación traduccioanl eIF-5A	0.3	0.018
Rpl15Ap	Proteína L15A de la subunidad 60S del ribosoma	0.31	0.011

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	pvalor
Rpl8Bp	Proteína L8B de la subunidad 60S del ribosoma	0.31	0.002
Rpl9Ap	Proteína L9A de la subunidad 60S del ribosoma	0.31	0.016
Rps20p	Proteína componente de la subunidad 40S del ribosoma	0.32	0.0023
Rps17Ap	Proteína 51 de la subunidad 40S del ribosoma	0.33	0.003
Tef4p	Subunidad del factor de elongación traduccional eEF1B	0.33	0.005
Ymr027Wp	Fosfatasa dependiente de metal	0.33	0.0034
Asc1p	Subunidad beta de proteínas G	0.34	0.00065
Leu2p	Beta isopropil malato deshidrogenasa	0.34	0.0083
Sah1p	S-adenosil L-homocisteína hidrolasa	0.35	0.0039
Rpl26Bp	Proteína L26B de la subunidad 60S del ribosoma	0.35	0.0077
Gdh1p	Glutamato deshidrogenasa	0.36	0.016
Ssa2p	Familia HSP70	0.36	0.043
Gus1p	Glutamil-tRNA sintetasa	0.37	0.03

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	pvalor
Hsp10p	Cochaperona de la matriz mitocondrial	0.37	0.015
Pfk2p	Subunidad de la fosfofructoquinasa	0.37	0.0014
Pfy1p	Profilina	0.38	0.034
Pgk1p	3 fosfoglicerato quinasa	0.38	0.02
Eft1p	Factor de elongación 2 (EF-2)	0.39	0.0096
Sse1p	ATPasa componente del complejo chaperona de la HSP90	0.39	0.014
Fas2p	Ácido graso sintetasa	0.39	0.046
Dcs1p	Hidrolasa implicada en el decapping del mRNA	0.4	0.0029
Hsp60p	Chaperona mitocondrial	0.4	0.029
Lsp1p	Componente del sistema endocítico	0.4	0.0018
Rpp1Bp	Proteína ribosomal P1 beta	0.4	0.046
Ala1p	Alanil-tRNA sintetasa	0.42	0.04
Rpl17Ap	Proteína L17A de la subunidad 60S del ribosoma	0.42	0.02
Mmf1p	Proteína mitocondrial requerida para la transaminación de la isoleucina	0.42	0.0016

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	pvalor
Prb1p	Proteinasa B mitocondrial	0.45	0.009
Krs1p	Lisil-tRNA sintetasa	0.46	0.006
Rps8Ap	Proteína componente de la subunidad 40S del ribosoma	0.53	0.015
Rps19Ap	Proteína componente de la subunidad 40S del ribosoma	0.55	0.015
Tpm1p	Tropomiosina	0.55	0.014
Pbi2p	Inhibidor citosólico de la proteinasa B vacuolar	0.61	0.025
Nhp6Bp	Proteína del grupo de alta movilidad (HMG)	0.61	0.0041
Atp1p	Subunidad de la F1F0 ATP sintasa	1.99	0.0087
Pdc6p	Piruvato descarboxilasa	4	0.01
Ole1p	Desaturasa de ácidos grasos	4.1	0.009
Aro9p	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	4.34	0.00082
Hsp30p	Inhibidor de la ATPasa Pma1p	7.08	0.0002
Cor1p	Subunidad del complejo ubiquinol citocromo c reductasa	7.09	0.005
Prc1p	Carboxipeptidasa vacuolar	22.31	0.00035

Tabla 4.6 Continuación

Nombre	Descripción	Mosto <i>trx1Δtrx2Δ</i> /wt	pvalor
Met14p	Adenilil sulfato quinasa	55.16	0.0000006
Mir1p	Transportador de fosfato mitocondrial	305.95	0.00001

Tabla 4.6 Proteínas con abundancia diferencial en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y en la cepa silvestre en mosto sintético. Se muestra el nombre de la proteína, su definición y su relación, o ratio, de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre en ambos medios y el valor de significatividad p.valor).

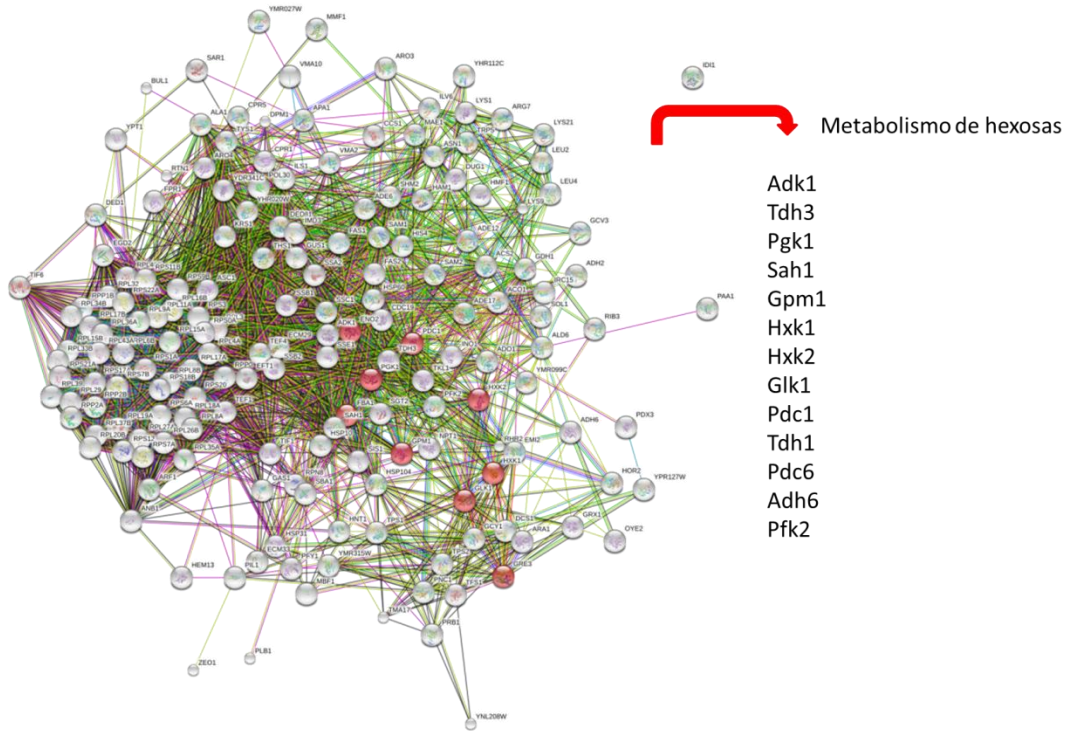
Los análisis comparativos entre el doble mutante y la cepa silvestre se extendieron, en el caso de los experimento en mosto sintético, al metaboloma con el objetivo de investigar los posibles efectos de la ausencia de las tiorredoxinas en las condiciones más próximas a las de vinificación. Los análisis metabolómicos se realizaron como se describe en el apartado 5.1.5 de Materiales y Métodos y se detectó un total de 247 metabolitos alterados, 180 con concentración aumentada y 67 reducida en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ*. Se analizan a continuación las principales rutas metabólicas afectadas y su relación con proteínas para las que también se observa variación de abundancia entre el doble mutante y la cepa silvestre.

4.4.6.1 Metabolismo de las hexosas

En la Figura 4.16 se muestra el enriquecimiento de todas las proteínas relacionadas con el metabolismo, diferencialmente disminuidas en el doble mutante respecto de la cepa silvestre en mosto sintético. Un grupo funcional enriquecido ha sido el del metabolismo de las hexosas (A). Debido al interés del crecimiento y viabilidad de *trx1Δtrx2Δ* en mosto sintético se decidió estudiar estas proteínas relacionadas con el metabolismo de las hexosas así como la producción de metabolitos que están regulando.

En la parte B se muestra una tabla con las proteínas, su definición y la relación, o ratio de abundancia entre el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre en mosto sintético. En la Figura 4.16 se representa la ruta de la glucólisis. En verde se marcan tanto las proteínas como los metabolitos detectados en menor abundancia en el doble mutante, y en rojo las proteínas y metabolitos detectados en mayor abundancia en el doble mutante a través de los análisis de proteómica y metabolómica, respectivamente.

A



B

Nombre	Proteína	Mosto MS300	SC Exponencial <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	SC Estacionario <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>
Adh6p	Alcohol deshidrogenasa	0.1		
Gpm1p	Fosfoglicerato mutasa	0.28		
Glk1p	Glucoquinasa 1	0.29		0.48
Pdc1p	Piruvato descarboxilasa	0.3		
Sah1p	Hidrolasa	0.35		
Pfk2p	Subunidad de la fosfofructoquinasa	0.37		
Adk1 p	Adenilato quinasa	0.48		0.9
Tdh3p	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	0.39		0.53

Continuación Tabla

Nombre	Proteína	Mosto MS300	SC Exponencial <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>	SC Estacionario <i>trx1Δtrx2Δ/wt</i>
Pgk1p	3- fosfoglicerato quinasa	0.38		
Aco1p	Aconitasa	0.38		1.5
Hxk2p	Hexoquinasa 2	0.45	0.6	0.49
Hxk1p	Hexoquinasa 1	0.48		0.35
Pdc6p	Piruvato descarboxilasa	4		

Figura 4.16 Proteínas analizadas en el experimento de fermentación en mosto sintético MS300 relacionadas con el metabolismo del carbono. Enriquecimiento de las proteínas presentes en el experimento de mosto sintético y selección de las proteínas relacionadas con el metabolismo del carbono (A). Cuadro resumen de las proteínas relacionadas con el metabolismo de las hexosas. Se muestra el nombre de la proteína, la descripción, el ratio de la abundancia de la proteína en el doble mutante frente a la cepa silvestre, así como la detección de esta proteína en otros experimentos diferentes al del mosto sintético (B).

Como se muestra en la Tabla 4.7 y se indica en la Figura 4.16, el análisis del proteoma detectó como menos abundantes en el doble mutante, las enzimas responsables del primer paso de fosforilación del azúcar de la glicolisis, de aldosas, la glucoquinasa 1 (ratio de abundancia 0.29), y de hexosas en general, hexoquinasa 1 (ratio de abundancia 0.48) y hexoquinasa 2 (ratio de abundancia 0.45). En la Figura 4.16 se representan también los metabolitos detectados como alterados en el análisis metabolómico, con el mismo código de colores. En la Figura 4.17 se muestran los datos de los metabolitos en el análisis del metaboloma. No hay diferencias significativas entre el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre en cuanto a la cantidad de glucosa pero si que hay menor cantidad de glucosa-1-fosfato, el primer metabolito de la ruta cuya fosforilación es dependiente de Hxk1p, Hxk2p y Glk1p, que están en menor abundancia en el mutante *trx1Δtrx2Δ* (Tabla 4.7), y también del siguiente, glucosa-6-fosfato.

La siguiente proteína que se encuentra en menor abundancia en el mutante *trx1Δtrx2Δ*, (ratio de abundancia 0.38), es Pfk2p, subunidad β de la fosfofructoquinasa. En este caso, a pesar de la menor abundancia de esta proteína, el producto de este paso de la glicólisis, fructosa-1,6-bisfosfato, está en mayor cantidad en el doble mutante, lo que podría indicar defectos en la sofisticada regulación del complejo fosfofructoquinasa, constituido por 4 heterodímeros de subunidades β y α (Pfk1p), ya que ambas subunidades parecen ser clave tanto para la catálisis y regulación alostérica del complejo por ATP, AMP y fructosa-1,6-bisfosfato (Rodicio et al., 2000).

A continuación, Tdh3p (ratio de abundancia 0.39 en mosto MS300), la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, que cataliza la primera oxidación clave para la síntesis de ATP acoplada a la glicólisis, que ocurre en la reacción siguiente, en una reacción tan favorable que no se detectan cambios en el intermediario entre ellas, el 1,3-bisfosfoglicerato, pero si en el producto de la reacción posterior, la de la fosfoglicerato quinasa **Pgk1p**, que transfiere el grupo fosforilo del el 1,3-bisfosfoglicerato al ADP para producir ATP, dando 3-fosfoglicerato (Figura 4.16). Pgk1p es 0.38 menos abundante en el doble mutante que en la cepa silvestre y, como se observa en la Figura 4.17, la cantidad de 3-fosfoglicerato, y también la de los dos intermediarios siguientes 2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato, está disminuida en el mutante *trx1Δtrx2Δ*

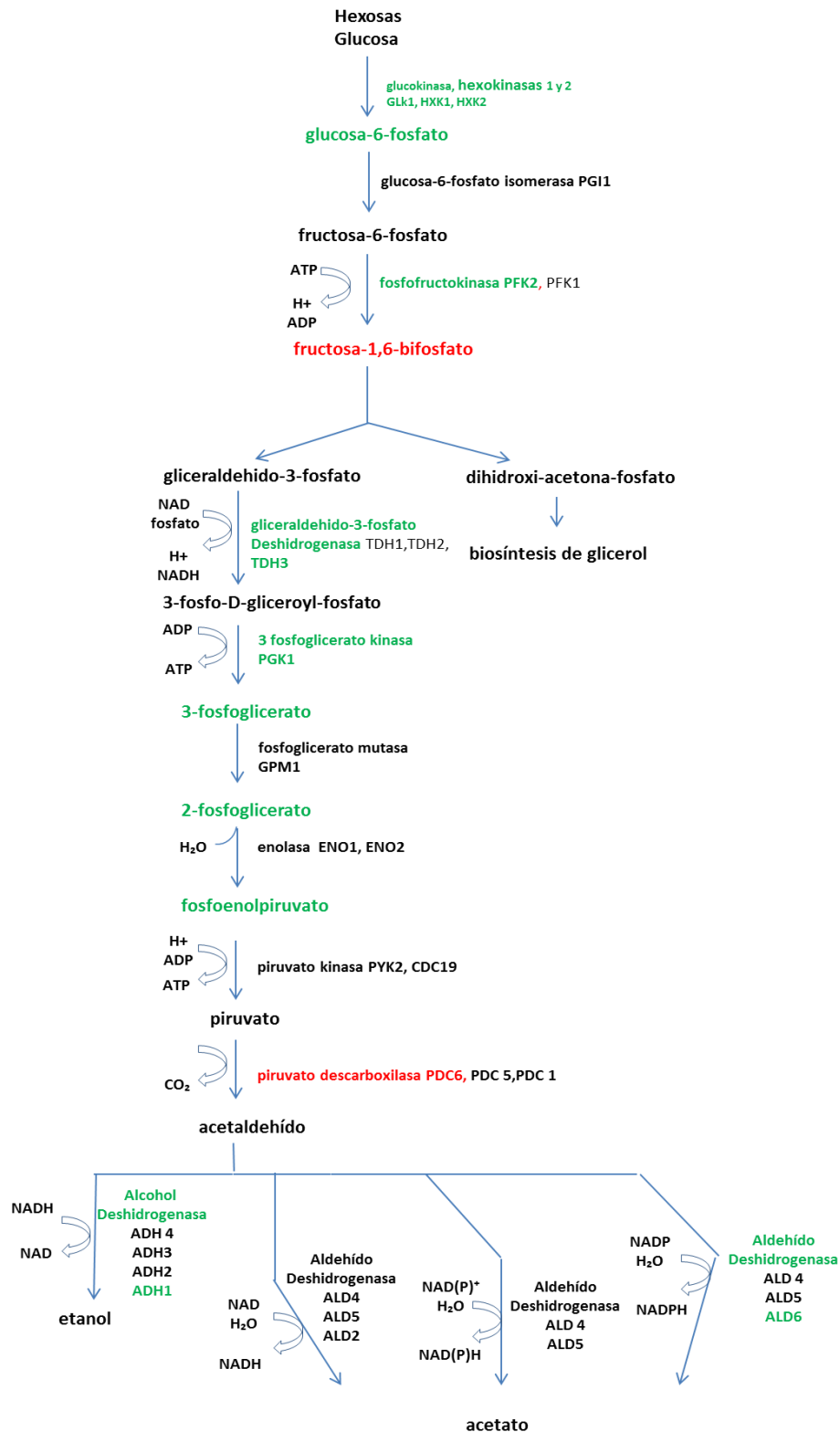


Figura 4.16 Glicólisis. Principales intermediarios de la ruta de la glucólisis y fermentación junto con enzimas, substratos y productos de las reacciones enzimáticas. En rojo se muestran proteínas y metabolitos que se encuentran en mayor abundancia tanto en el análisis proteómico como en el análisis metabolómico (abundancia en el doble mutante con respecto a la cepa silvestre mayor de 1.5 en análisis proteómicos) y en verde las que tienen menor abundancia tanto en el análisis proteómico como en el metabolómico (abundancia de la proteína entre 0-0,66 de doble mutante/silvestre).

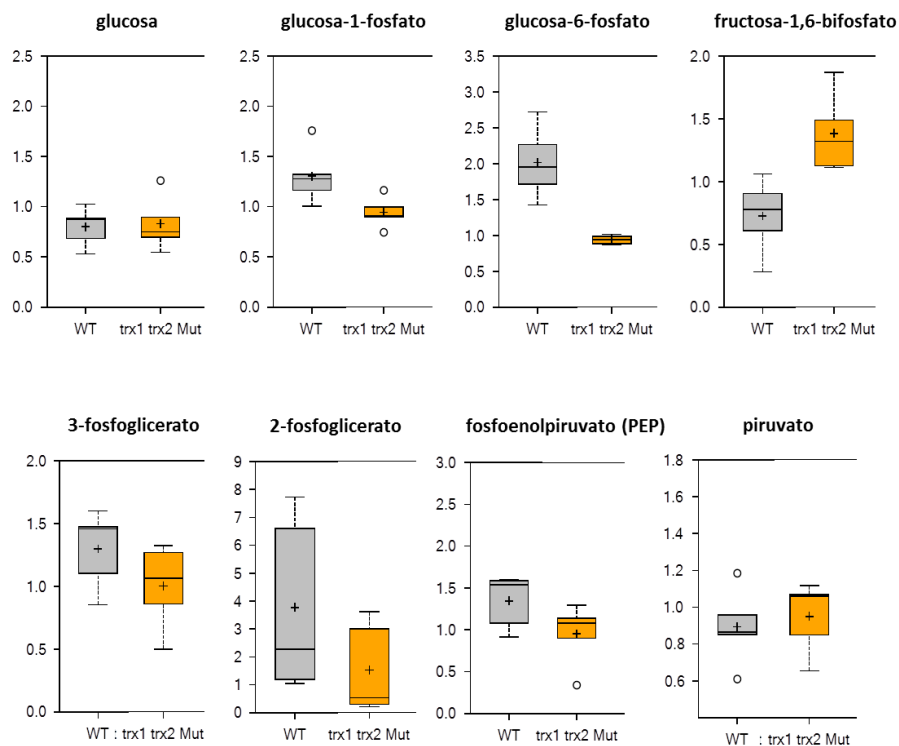


Figura 4.17 Diferencias en la producción de metabolitos glicolíticos durante la fermentación en mosto sintético. Se representa un diagrama en cajas de los metabolitos detectados por el análisis del metaboloma, en gris se representa la cepa silvestre y en amarillo el doble mutante. Se muestra la abundancia del metabolito. El valor medio está representado por la raya de en medio de la caja y su valor máximo y mínimo de distribución por las barras de error superiores e inferiores respectivamente. El círculo demuestra puntos extremos.

Estos resultados indican un defecto generalizado en la ruta glicolítica en el doble mutante. Estudios previos en nuestro laboratorio han descrito el importante papel de Trx2p en la regulación transcripcional de ciertas enzimas glicolíticas, como la hexoquinasa 2, Hxk2p (Gómez-Pastor et al., 2012b) y también en la protección frente a carbonilación de enzimas glicolíticas y de fermentación, como la alcohol deshidrogenasa 1 Adh1p (Gómez-Pastor et al., 2012a), produciendo efectos importantes en las actividades enolasa, piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. Se detectó la proteína Pdc6p, una isoforma minoritaria de la piruvato descarboxilasa que no se expresa en crecimiento en glucosa y está relacionada con la degradación de aminoácidos, induciéndose en condiciones de limitación de azufre. Como ya se ha comentado a lo largo de la tesis, el doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas tiene un defecto en la reducción de la enzima PAPS reductasa por lo que tiene un defecto en la asimilación de azufre. Debido a este defecto, podría aumentar la abundancia hasta cuatro veces más en el doble mutante, pero esto no está afectando a la acumulación de piruvato.

Resultados y Discusión

A la vista de estos resultados, se realizó un experimento de crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono con el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre, utilizando el mutante *trr1Δ* como control, como ya se ha utilizado en varias ocasiones, para dilucidar si el fenotipo observado a nivel de proteoma y metaboloma en el doble mutante en las tiorredoxinas se debe a un defecto en la asimilación de glucosa y fructosa. Se utilizó mosto sintético MS300, medio rico YP con galactosa, con glicerol, con glucosa y con fructosa como fuentes de carbono y se obtuvieron las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura 4.18, a partir de minicultivos en placas multipocillo durante 16 h y tomando medidas de densidad celular cada 15 minutos. Como se puede observar, tanto en medio rico YPD (glucosa) como YPF (fructosa) hay un crecimiento exponencial en las tres cepas, siendo la entrada de la fase lag en la cepa silvestre a las 13 h (800min) mientras que en las cepas mutantes se retrasa la entrada en fase lag a 16h (1000min). Se observa que el doble mutante de las tiorredoxinas, no alcanza la misma densidad celular que la cepa silvestre y que el mutante *trr1Δ*, lo que indica, como ya se ha discutido anteriormente, un crecimiento menor.

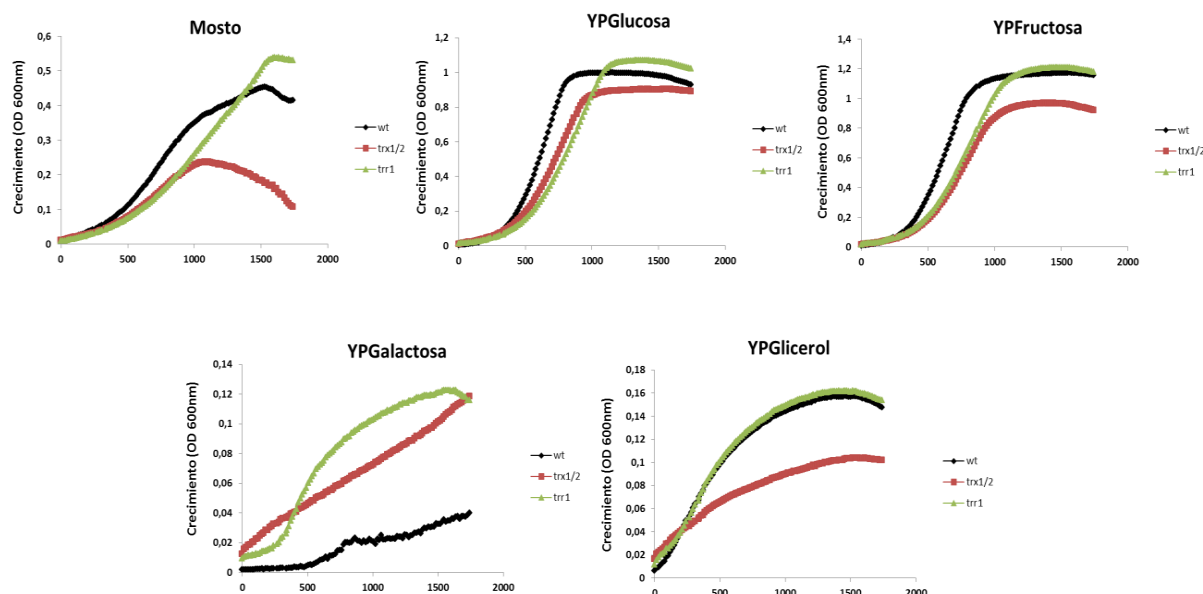


Figura 4.18 Curvas de crecimiento celular ($D.O_{600nm}$) del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre, utilizando el mutante *trr1Δ* como control, en medios con diferentes fuentes de carbono. Crecimiento en placa 96 pocillos en medios con galactosa, glicerol, glucosa y fructosa como únicas fuentes de carbono y en mosto sintético, como se describe en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron por triplicado usando dos réplicas biológicas para cada una de las cepas en cada experimento.

En las curvas de crecimiento de las 3 cepas en mosto sintético, donde la escala el eje de ordenadas ha sido ampliada para ver mejor los perfiles de las curvas, se observa un crecimiento menor al observado en los medios YPD e YPF, que también imponen un metabolismo fermentativo, lo que es debido fundamentalmente a que estos medios tienen sólo un 2% de azúcar mientras que el mosto sintético tiene 20%. No se observa diferencia en las curvas de crecimiento en mosto sintético de la cepa silvestre y del mutante *trr1* Δ , mientras que, en el doble mutante, el crecimiento es mucho menor, como se ha mostrado en el inicio de este capítulo, Figuras 4.4 y 4.5, alcanzando su máximo de densidad celular a 16 h de crecimiento y disminuyendo posteriormente. En las curvas de crecimiento en medios con fuentes de carbono respirofermentativas y respirables (galactosa y glicerol respectivamente), donde la escala del eje de ordenadas ha sido muy ampliada, apenas se observa crecimiento a lo largo del proceso, lo que podría deberse a la escasa aireación en las condiciones de los minicultivos en placas multipocillo. Por ellos se analizó el crecimiento en este tipo de fuentes de carbono mediante experimentos de goteo en placas de YPD con glicerol y con galactosa, que se muestran en la Figura 4.19.

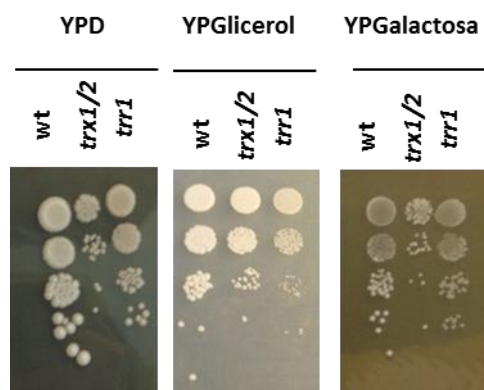


Figura 4.19 Crecimiento en goteos de las cepas en condiciones de respiración.

Las tres cepas de estudio son capaces de crecer en medio tanto como con glicerol como con galactosa por lo que, el defecto de crecimiento que se observa en la Figura 4.18 se debe a algún defecto de crecimiento por las condiciones utilizadas y no por un defecto de las cepas. Se realizó un seguimiento del consumo de azúcares de los medios con azúcares reductores, YPD, YPF y YPGal y Mosto, tal como se describe en 5.1.1 de Materiales y Métodos, a las 28 h de crecimiento. En los medios fermentables con 2% de azúcares (glucosa y fructosa) las 3 cepas han sido capaces de consumir todo el azúcar presente en el medio. En el caso de YPGal, que es un medio respirofermentable, se observa que todavía hay azúcar en el medio. Como cabe de esperar, Figura 4.20 A, la cepa silvestre en mosto sintético, a 28 horas de crecimiento en este mosto, ha sido incapaz de consumir los azúcares presentes en el mosto al igual que *trx1* Δ *trx2* Δ y *trr1* Δ que han consumido un poco los azúcares presentes en el mosto.

Resultados y Discusión

Este resultado en mosto sintético indica que la levadura requiere un proceso de adaptación a ese estrés osmótico que ocurre cuando hay tanta concentración de azúcares en el medio. Se realizó un goteo en placas de YPD de todas las cepas de estudio y de todas las condiciones ensayadas al final del experimento (28h) para observar la viabilidad celular y si, había diferencias en función del medio.

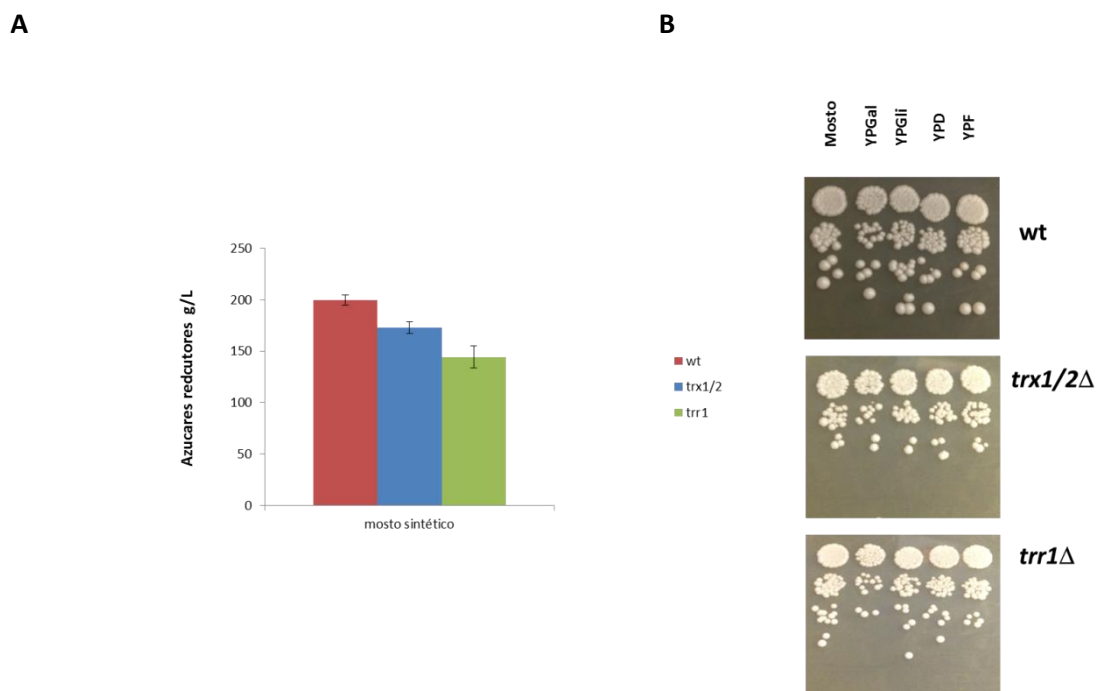


Figura 4.20 Consumo de azúcar y viabilidad a las 28 horas de crecimiento en mosto sintético, YP con galactosa, glicerol, glucosa y fructosa. Medida de los azúcares reductores al final del experimento de crecimiento en placa multipocillo en g/L (**A**), viabilidad a las 28h de crecimiento en los diferentes medios de estudio en la cepa silvestre y en los mutantes *trx1/trx2* y *trr1* (**B**). Los experimentos se realizaron por triplicado utilizando dos réplicas biológicas de cada cepa.

El doble mutante *trx1* Δ *trx2* Δ presenta una menor viabilidad que la cepa silvestre y que el mutante *trr1* Δ , pero no hay diferencias de viabilidad en los distintos medios ensayados. La cepa silvestre no presenta diferencias de viabilidad en ningún medio y el mutante *trr1* Δ solo presenta cierto defecto de crecimiento en galactosa y fructosa. Se realizaron también experimentos de capacidad fermentativa, medida como producción de CO₂ en mosto sintético MS300 en la cepa silvestre y en el doble mutante para determinar el impacto de la ausencia de tiorredoxinas sobre la ruta glicolítica en una situación puntual en que el crecimiento celular no afecta a la medida ya que el resultado se muestra en mL de CO₂ por mL de células. En la Figura, 4.21, se muestra la producción de CO₂ medida cada 10 minutos durante 7h, como se describe en el apartado 5.1.4 de Materiales y Métodos.

Se observa una menor capacidad fermentativa del doble mutante, probablemente sea consecuencia de un metabolismo de los azúcares más ralentizado consistente con el defecto en la fosforilación de la glucosa que afecta especialmente a la asimilación de este metabolito cuando las concentraciones son altas, como en el mosto sintético.

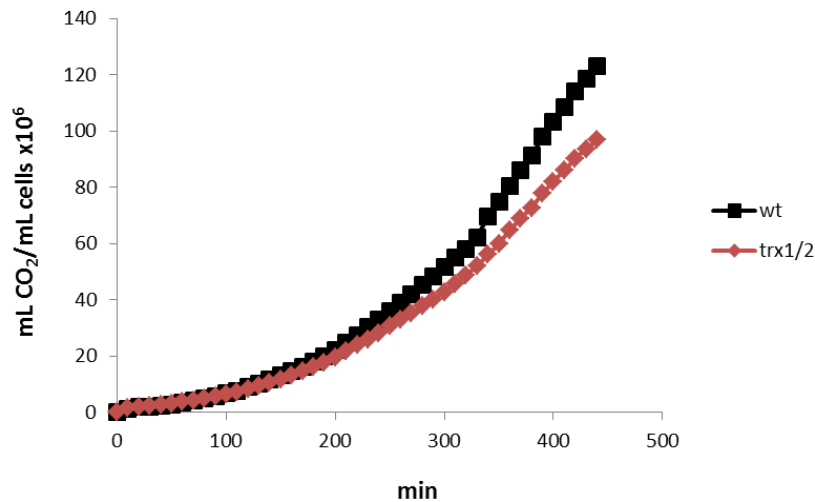


Figura 4.21 Capacidad fermentativa (mL CO₂/10⁶ células) en mosto sintético MS300 para la cepa silvestre y para la cepa mutante de tioredoxinas citosólicas a partir de precultivos de toda la noche en medio YPD.

4.4.6.2 Ciclo de Krebs

La ruta glucolítica no es únicamente un proceso que conlleva a la obtención de energía para la levadura, constituye además una ruta que proporciona a las levaduras metabolitos que puedan utilizarse como puntos de partida para la biosíntesis de moléculas asociadas al aumento de biomasa. En este caso, el piruvato constituye el punto de partida para la síntesis de diferentes moléculas, como oxalacetato, succinato, ácidos orgánicos y aminoácidos, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs.

La producción de estas moléculas tiene lugar al inicio de la fermentación alcohólica, cuando las actividades piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa son bajas, y ocurre en la mitocondria siendo además la vía más importante para el catabolismo de todos los nutrientes. En la Figura 4.22 se muestra un esquema del ciclo. En rojo, se marcan tanto los metabolitos como las proteínas detectados en el análisis del metaboloma y proteoma respectivamente que se encuentran en mayor abundancia en el doble mutante con respecto a la cepa silvestre. En verde se muestran los que se encuentran en menor abundancia. En morado se muestran otras rutas relacionadas con el ciclo de Krebs.

Resultados y Discusión

En la Figura 4.23, donde se muestran los metabolitos detectados en el metaboloma, se observa que no hay diferencias significativas entre la producción de piruvato en el doble mutante con respecto al silvestre. Sin embargo, a pesar de partir de una cantidad similar de piruvato y de no tener diferencias en la abundancia de las proteínas implicadas, en el doble mutante hay una mayor cantidad del metabolito citrato, Figura 4.23. El citrato está presente en la mitocondria en el ciclo de Krebs. Al ser la membrana mitocondrial interna impermeable al acetil-coA y al requerir acetil-coA en el citosol para la biosíntesis de ácidos grasos, es el citrato el que permite disponer de acetil-coA en el citosol, a través de la citrato liasa con consumo de ATP. Como se discutirá más adelante, el doble mutante presenta un aumento significativo en los metabolitos intracelulares de casi todos los ácidos grasos detectables en este análisis del metaboloma.

Como se observa en la Figura 4.22, en los análisis del proteoma, se detectó la aconitasa hidrolasa, Aco1p, se encuentra 0.38 veces en el doble mutante con respecto a la cepa silvestre (Tabla 4.5). Esta proteína regula dos pasos en el ciclo de Krebs, dando cis-aconitato e isocitrato, metabolitos más abundantes en el doble mutante que en la cepa silvestre, probablemente por la mayor disponibilidad de citrato. Hay una mayor cantidad de succinato. El succinil-coA es un importante precursor para la biosíntesis de porfirinas y de grupos HEMO. La formación de tetrapirroles es esencial para la producción de porfirinas, las cuales constituyen los grupos HEMO (Fe^{2+}/Fe^{3+}) de los citocromos y sirven de sensores y están presentes en el sitio catalítico de muchas enzimas (como la RNR). Esta mayor cantidad del metabolito succinato, pero no más succinil CoA es porque se destina menos a la producción de succinil CoA produce menos precursores para la síntesis de porfirinas y grupos hemo. Hay una menor cantidad en el doble mutante de fumarato y maleato, y una mayor de malato.

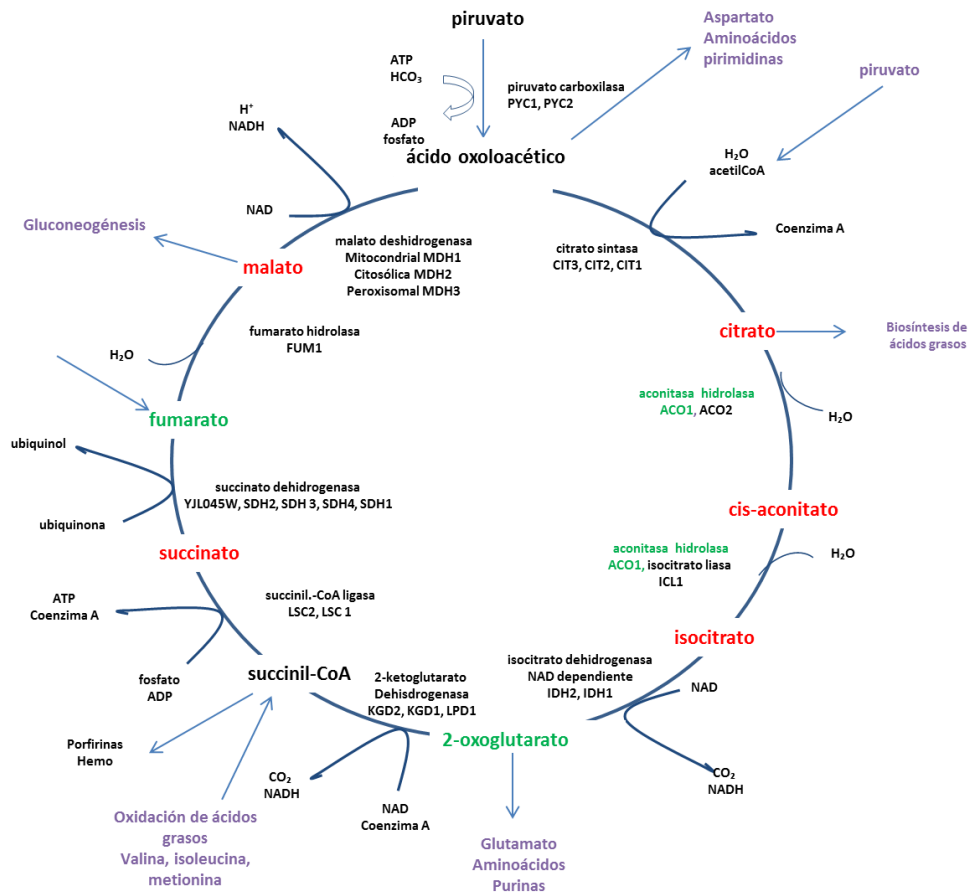


Figura 4.22 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Principales intermediarios de la ruta de los ácidos tricarboxílicos junto con enzimas, substratos y productos de las reacciones enzimáticas. En verde se muestran aquellas proteínas y metabolitos que tienen una menor abundancia en doble mutante con respecto al silvestre. En rojo se muestran aquellas proteínas y metabolitos que tienen una mayor abundancia en doble mutante con respecto al silvestre. En morado, se muestran otras rutas relacionadas con el metabolito.

En la Figura 4.23, se observa que hay menos cantidad de oxocetoglutarato en el doble mutante. El glutamato procede del oxocetoglutarato vía transaminación con otros aminoácidos o vía glutamato deshidrogenasa. Este metabolito es importante para la biosíntesis de aminoácidos y para la de las purinas como se discutirá más adelante, Figura 4.25.

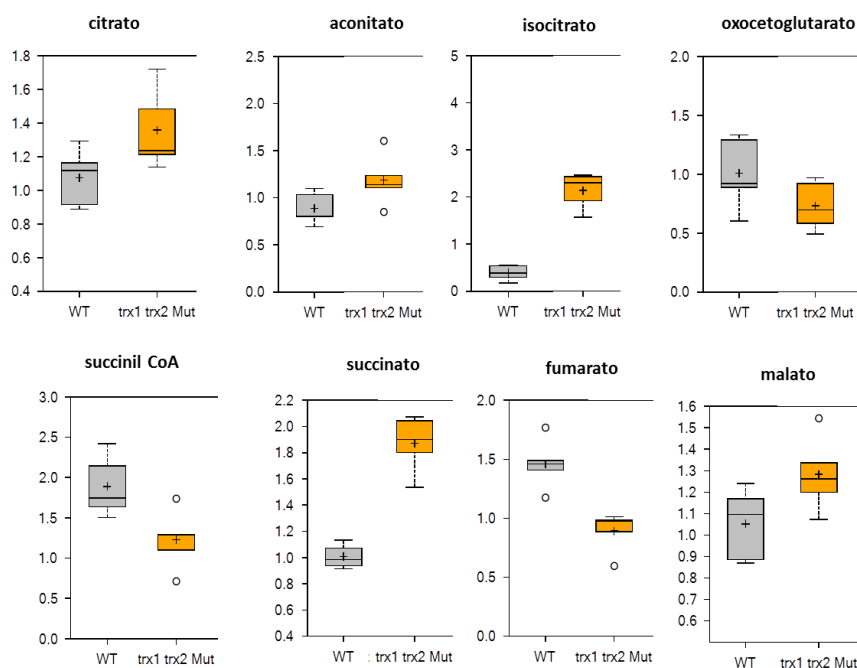


Figura 4.23 Diferencias en la producción de metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos durante la fermentación en mosto sintético. En la figura 4.22 se muestran la posición de estos metabolitos en el ciclo de Krebs. En rojo se muestran las proteínas y metabolitos en mayor abundancia en el doble mutante y en verde, en mayor abundancia.

4.4.6.3 Ruta de las pentosas fosfato

Por su interés en el metabolismo redox se estudió también la ruta de las pentosas fosfato, estrechamente relacionada con la glucólisis, durante la cual se obtiene la ribosa necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, a partir de la glucosa, obteniéndose además poder reductor en forma de NADPH. Es una ruta eminentemente biosintética requerida en células que se encuentran en fase de división para la producción de todo tipo de componentes celulares. Se observa en la Figura 4.24 que varios metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato están en menor cantidad en el doble mutante. Se destaca la ribosa-5-fosfato que en el doble mutante es mucho menor abundante que en la cepa silvestre. La transcetolasa es necesaria para la producción de gliceraldehído-3-fosfato y éste para la producción de fructosa-6-fosfato, lo que conecta con la glucólisis. Dado que no se detecta diferencias en la abundancia de las enzimas de la ruta, la disminución de los niveles de metabolitos puede estar ocasionada por un menor flujo debido a la baja disponibilidad de glucosa-6-fosfato.

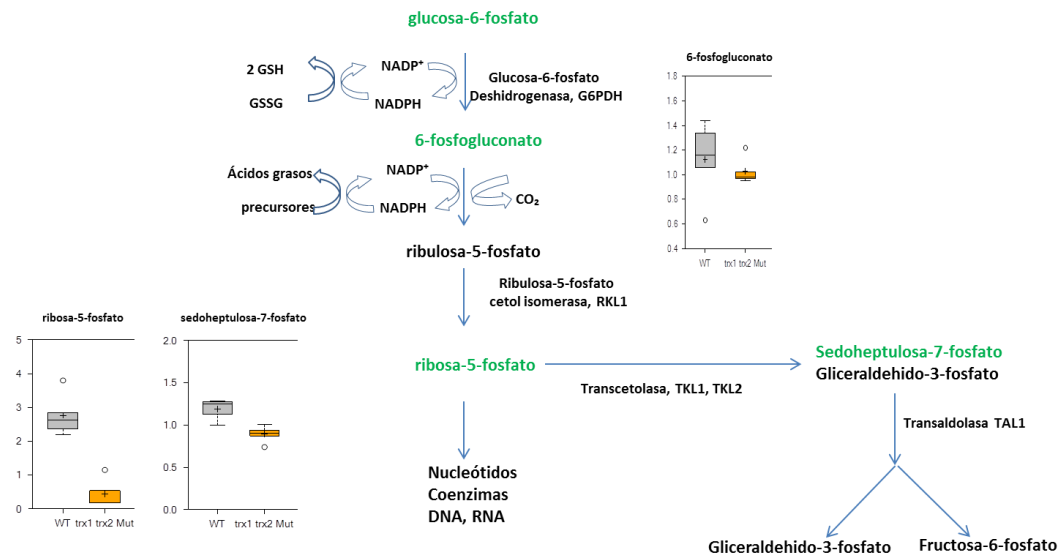


Figura 4.24 Diferencias en la producción de metabolitos de la ruta de ruta de las pentosas fosfato durante la fermentación en mosto sintético.

4.4.6.4 Metabolismo de las bases nitrogenadas

4.4.6.4.1 Bases púricas

Se estudió, a través de los datos obtenidos en el análisis del metaboloma, los metabolitos relacionados con la síntesis de purinas y de pirimidinas con el fin de esclarecer el estado metabólico del *trx1Δtrx2Δ* en fermentación alcohólica en mosto sintético. En la Figura 4.25 se resumen los metabolitos detectados del metabolismo de las purinas que muestran diferencias significativas. Se muestran tanto metabolitos relacionados con su síntesis como relacionados con su catabolismo hasta hipoxantina y xantina. Como se puede observar, todos los metabolitos se encuentran en mayor cantidad pesar de que la ribosa-5-fosfato se encuentra en menor cantidad en el doble mutante (Figura 4.24).

Resultados y Discusión

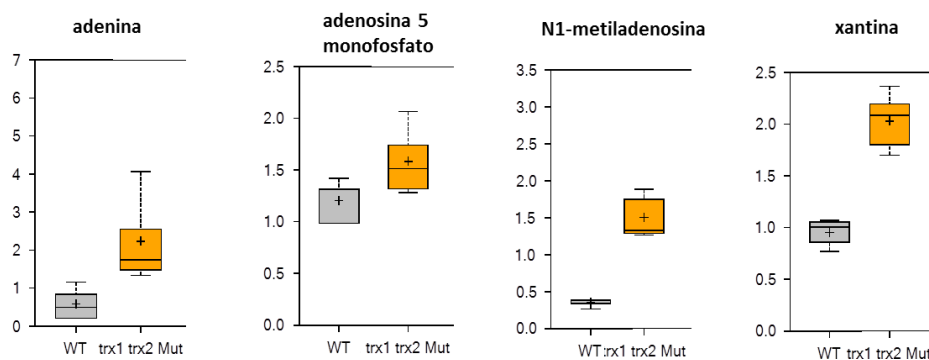


Figura 4.25 Diferencias en la producción de metabolitos del metabolismo de purinas durante la fermentación en mosto sintético.

4.3.6.4.2 Bases pirimidínicas

A diferencia de las bases púricas, las pirimidinas no se sintetizan como nucleótidos. Primero se sintetiza el anillo de pirimidina a partir de bicarbonato, aspartato y glutamina, y luego se une el precursor PRPP. Como se observa, Figura 4.26, también hay un aumento en algunos metabolitos en el doble mutante, como ya se ha descrito para las purinas. Este aumento en el metabolismo de ambos tipos de bases nitrogenadas podría tener su origen en una deficiencia en la síntesis de dNTPs, y por lo tanto en la síntesis de DNA. Como se ha comentado a lo largo del Capítulo 3 y 4, las tiorredoxinas citosólicas modulan la reducción de la ribonucleótido reductasa y por lo tanto su actividad. En ausencia de las tiorredoxinas citosólicas, la célula compensa la deficiencia en la actividad de la RNR con un aumento en las bases nitrogenadas.

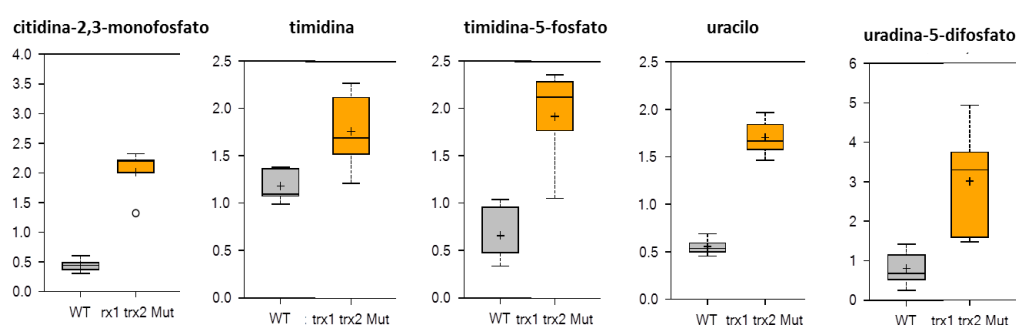


Figura 4.26 Diferencias en la producción de metabolitos del metabolismo de pirimidinas durante la fermentación en mosto sintético.

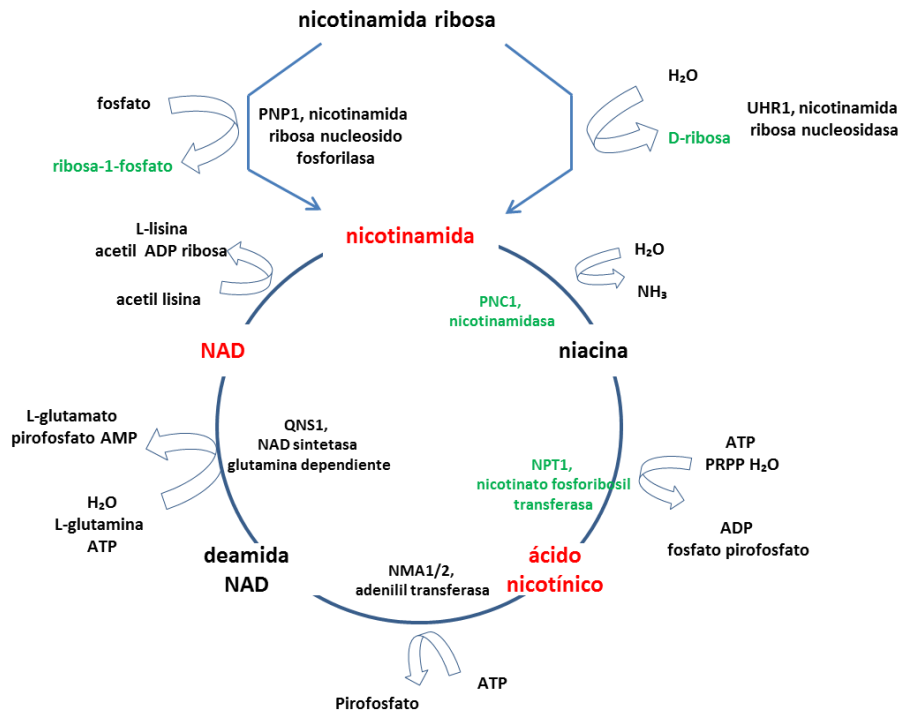
Si observamos la Tabla 4.5 donde se representa las proteínas detectadas en el análisis del proteoma en mosto sintético, se puede observar la disminución de la abundancia de algunas proteínas relacionadas con el metabolismo de las bases nitrogenadas y nucleótidos, por ejemplo, la nucleósido trifosfato pirofosfodrilasa, Ham1p (0.21 veces en el doble mutante frente al salvaje), Ade17p, enzima de la biosíntesis *de novo* de las purinas (0.23 veces) y Ado1p que es una adenosina quinasa (0.26 veces).

4.4.6.5 Metabolismo del NAD

En el análisis metabolómico se resaltó el aumento de la síntesis del poder reductor a través del metabolismo de NAD. Se muestra en la Figura 4.27 A un resumen de la ruta de biosíntesis del mismo. En rojo se resaltan aquellas proteínas que se han detectado en mayor abundancia y en verde los de menor abundancia en el doble mutante en el análisis del proteoma y metaboloma respectivamente, en el panel B se muestran los metabolitos. Hay un aumento de NADH, NAD⁺, nicotinamida, trigonelina y ADP ribosa.

En el análisis del proteoma se han detectado dos proteínas, una nicotinamidasa, Pnc1p, que es menos abundante (relación de abundancia 0.46) en el *trx1Δtrx2Δ* frente a la cepa silvestre, y una nicotinato transferasa, Npt1p, que también está en menor cantidad (ratio 0.15). Estos valores de la abundancia de la proteína no explican fácilmente la mayor cantidad de metabolitos en el doble mutante pero sí que reflejan la necesidad del doble mutante de modificar sus rutas metabólicas de control redox.

A



B

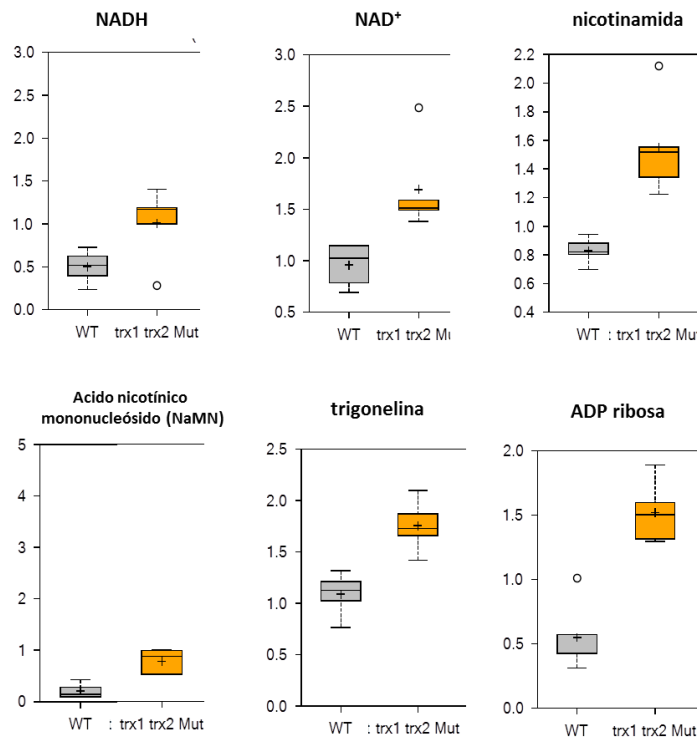


Figura 4.27 Diferencias en la producción de metabolitos del ruta de salvamento de la nicotinamida durante la fermentación en mosto sintético. Ruta de la biosíntesis de NAD. En rojo se muestran los metabolitos detectados en mayor abundancia en el doble mutante frente a la cepa silvestre. En verde, proteínas y metabolitos en menor abundancia en el doble mutante frente a la cepa silvestre (A). Metabolitos implicados en la ruta con diferencias significativas entre la cepa silvestre y el doble mutante (B).

4.4.6.6 Metabolismo de lípidos

Dado que Ole1p, la única desaturasa de ácidos grasos presente en *S.cerevisiae*, es una de las proteínas detectadas como más abundante (relación de abundancia 4) en el análisis proteómico del doble mutante de las tioredoxinas (Tabla 4.5), se analizó en detalle los datos metabolómicos del metabolismo de los ácidos grasos ya que, como se muestra en la Figura 4.29, la mayoría de metabolitos de ácidos grasos se encuentra en mayor abundancia en el mutante *trx1Δtrx2Δ*. En la Figura 4.28 se resume la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, mostrando en rojo las proteínas detectadas por el análisis del proteoma y del metaboloma cuya abundancia es mayor en el doble mutante, en verde las de menor abundancia.

Ole1p desatura los ácidos grasos saturados de 16 y de 18 carbonos (C16, C18) a ácidos grasos monoinsaturados (C16:1 y C18:1). Se ha descrito que los niveles de mRNA de *OLE1* y su actividad se reprimen cuando se añade 16:1 y 18:1 al medio. El ácido linoleico poliinsaturado (18:2), que no es producto de la actividad de la desaturasa Ole1p, también en un potente represor de su síntesis (McDonough et al., 1992).

Los ácidos grasos insaturados (UFAs) tienen profundos efectos sobre la fluidez y función de las membranas biológicas. Microorganismos, plantas y animales, regulan la síntesis de UFAs durante condiciones ambientales tales como la disminución de nutrientes y también se ha descrito la relación de UFAs con procesos celulares esenciales como la diferenciación celular y la replicación del DNA (Heird and Lapillonne, 2005; Mansilla and De Mendoza, 2005).

Ole1p se localiza en el retículo endoplasmático (ER) donde reside la mayor parte de la maquinaria de biosíntesis de lípidos, los cuales se distribuyen a lo largo de las membranas de la célula representando un 70% del total de ácidos grasos celulares. Otras dos proteínas alteradas en el análisis proteómico son las ácido grasos sintetas Fas1p y Fas2p, que son menos abundantes en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ/wt* que en la cepa silvestre, con relaciones de abundancia 0.29 y 0.39, respectivamente. Si observamos los ácidos grasos saturados de 16 y de 18 carbonos (16:0 y 18:0) hay una mayor cantidad de estos metabolitos en el doble mutante a pesar de que las proteínas Fas1p y Fas2p se encuentran en menor abundancia. Si observamos los ácidos grasos insaturados (16:1 y 18:1) también están en mayor cantidad en el doble mutante, esta vez de manera consistente con la mayor abundancia de la desaturasa Ole1p (Figura 4.29).

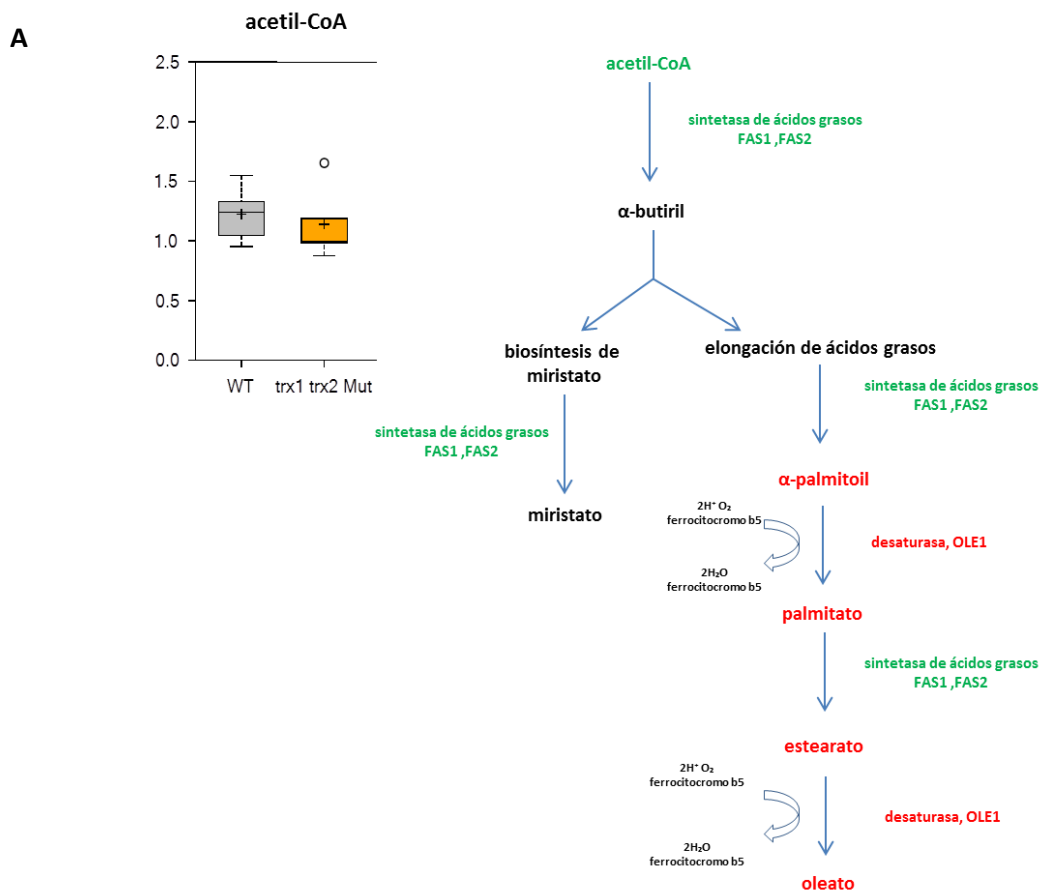


Figura 4.28 Ruta de la biosíntesis de lípidos. En rojo se marcan las proteínas y metabolitos que están en mayor abundancia en el doble mutante frente a la cepa silvestre y en verde los de menor abundancia.

Ole1p requiere energía para desaturar. Esta energía la obtiene a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial dependiente de oxígeno. Otras proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el doble mutante (Figura 4.5) están relacionadas con la respiración. Mcr1p es una NADH citocromo B5 reductasa mitocondrial, 3.15 veces más abundante en el doble mutante y Cor1p, 7.09 veces más abundante, es una subunidad del complejo ubiquinol citocromo c reductasa. Prc1p es una carboxipeptidasa vacuolar que se encuentra 22.31 veces más abundante y Mir1p es un transportador mitocondrial de fosfato, 305.95 veces más cantidad en el doble mutante.

A pesar de que el doble mutante se encuentra en un medio fermentativo, presenta un aumento en muchas proteínas mitocondriales y además un aumento en la biosíntesis de ácidos grasos, lo que sugiere que el doble mutante presenta una tasa de respiración aumentada respecto del cepa silvestre.

Es posible que esa respuesta obedezca a su defecto de crecimiento y debido al mayor estrés oxidativo que supone la ausencia de las tiorredoxinas, así como a las especiales condiciones que impone el crecimiento en mosto sintético, como son el estrés osmótico por la gran cantidad de azúcares y la cantidad de etanol que se produce, de manera que el doble mutante activa una serie de mecanismos que implican a varias proteínas mitocondriales y a la biosíntesis de ácidos grasos.

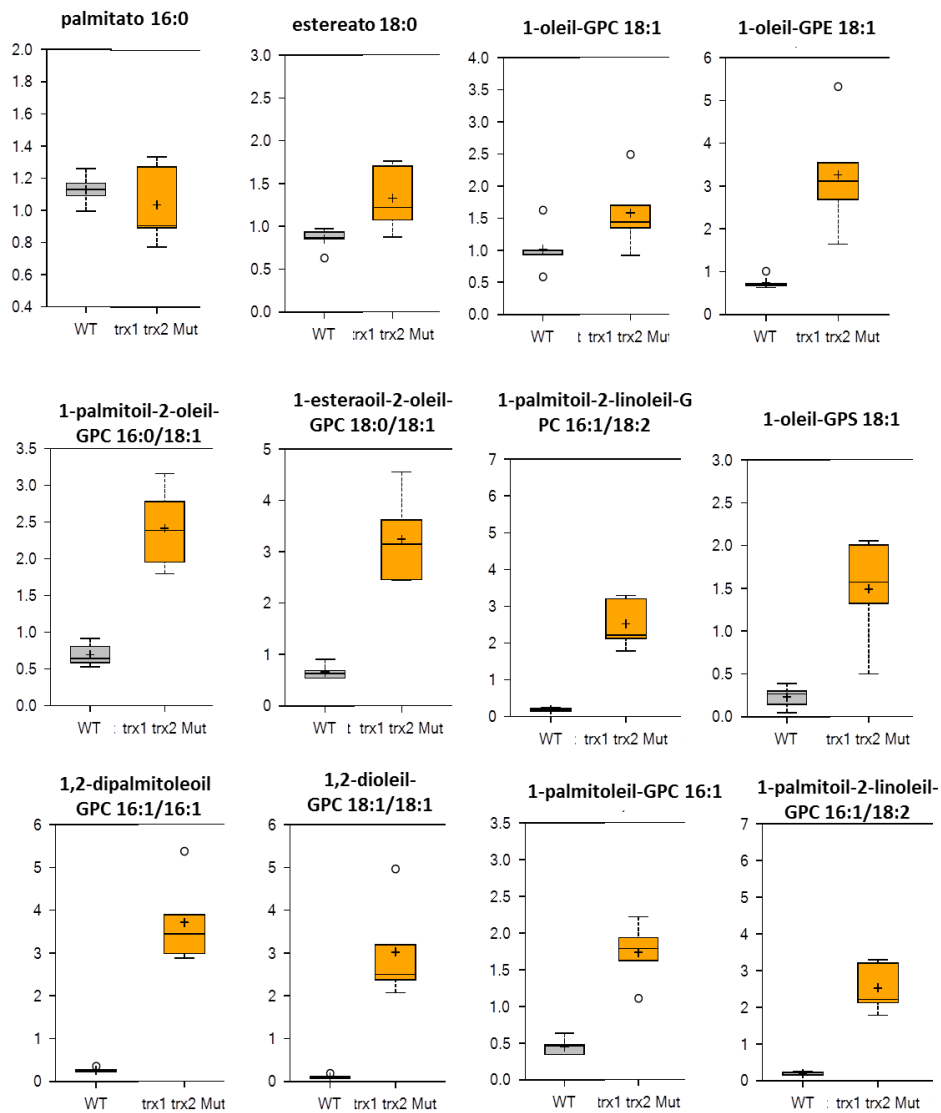


Figura 4.29 Diferencias en la producción de metabolitos durante la fermentación en mosto sintético. Biosíntesis de lípidos.

4.4.6.7 Metabolismo del glutatión

Como se ha comentado al inicio del capítulo, el glutatión está implicado en muchos procesos biológicos, incluyendo la síntesis de proteínas y DNA, transporte, actividades enzimáticas, metabolismo y protección celular, por ello se analizó el impacto de la delección de las tiorredoxinas en el metabolismo del glutatión. El glutatión es un tripéptido sintetizado por la acción consecutiva de la gamma-glutamilcisteína sintetasa y por la glutatión sintetasa como se muestra en la Figura 4.30. La γ -glutamiltanspeptidasa cataliza la transferencia de γ glutamil a distintos aceptores aminoacídicos, generando compuesto una variedad de metabolitos de tipo γ -glutamil aminoácido.

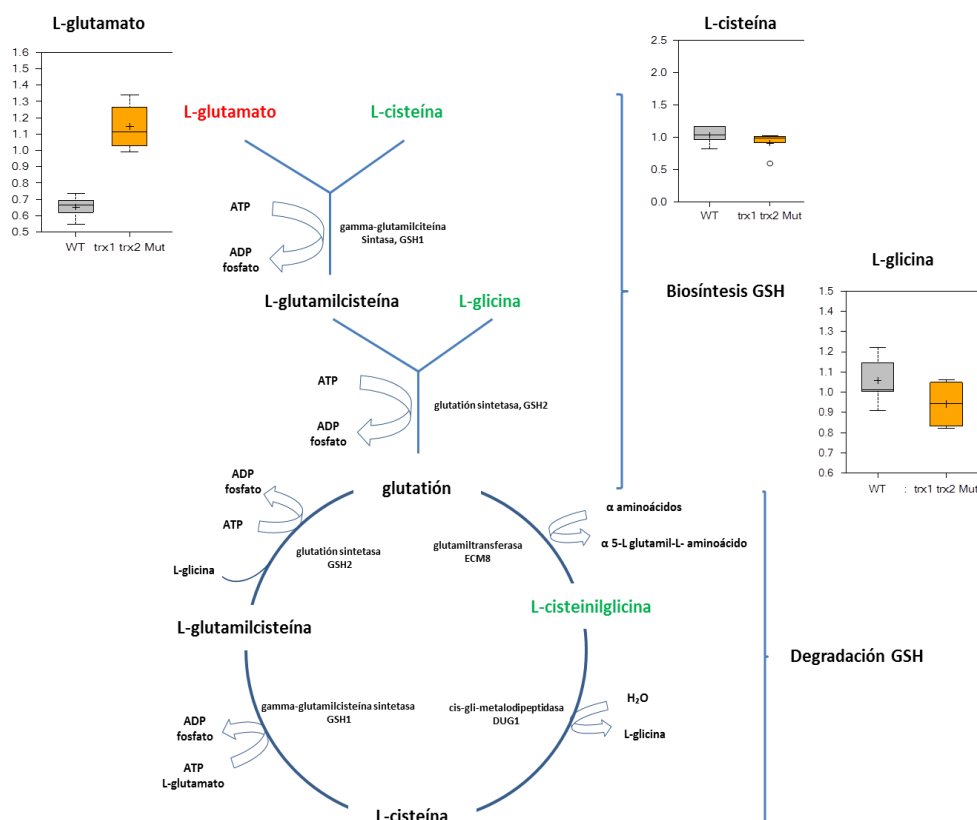


Figura 4.30 Metabolismo del glutatión. En rojo se marcan los metabolitos que están en mayor abundancia en el doble mutante frente a la cepa silvestre y en verde los de menor abundancia.

En la Figura 4.31 se muestran los metabolitos detectados en el análisis implicado en la biosíntesis del glutatión. Se detecta mayor cantidad del GSSG y menor del GSH en el doble mutante que en la cepa silvestre en mosto sintético. Hay que destacar que estos resultados no se correlacionan con los obtenidos en las determinaciones de glutatión en medio mínimo completo, SC, en estado exponencial y estacionario (Figura 4.5).

En estos casos, se observaba que hay un aumento del glutatión oxidado (GSSG) de la cepa silvestre respecto del mutante tanto en fase exponencial como estacionaria en SC y también un aumento en el glutatión reducido y al analizar la relación GSH/GSSG se observaba un aumento de la misma, tanto en fase exponencial como estacionaria en SC, datos que no resultaban fácilmente interpretables. De acuerdo con el análisis metabolómico, en fermentación en mosto sintético, hay mayor cantidad de glutatión oxidado y menor del reducido en el doble mutante. Si observamos algunos metabolitos de la ruta, se observa que hay mayor cantidad del sustrato glutamato en el doble mutante mientras que hay menos glicina y no hay apenas diferencia de cisteína. El análisis proteómico no indica variación de las enzimas implicadas en la síntesis de glutatión que justifique la alteración de estos metabolitos.

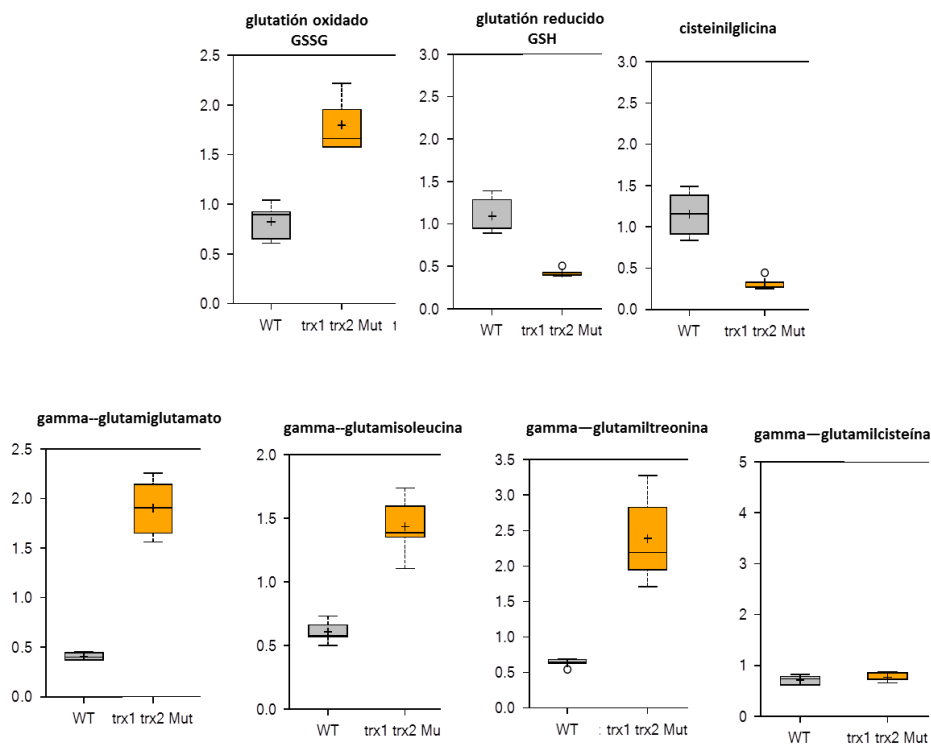


Figura 4.31 Diferencias en la producción de metabolitos del metabolismo del glutatión durante la fermentación en mosto sintético.. Metabolitos implicados en la ruta con diferencias significativas entre el silvestre y el doble mutante.

Otros dos metabolitos que se encuentran destacados en la Figura 4.31, pertenecientes a la ruta de degradación del glutatión, son la cisteinilglicina y γ -glutamilmilcisteína, cuyas acumulaciones disminuyen y no se ve afectada, respectivamente, en el doble mutante. Respecto del resto de γ -glutamil aminoácidos, tanto los mostrados en la Fig 4.31, como otros no mostrados, presentan un aumento en el doble mutante.

En resumen, en el metaboloma del doble mutante en mosto sintético, donde predomina un metabolismo fermentativo, hay mayor cantidad de glutatión oxidado. Esto puede ser debido, a que la ausencia de las tiorredoxinas produce un estrés oxidativo interno por la ausencia de protección y detoxificación.

Como se ha comentado anteriormente, en el doble mutante hay mayor abundancia de proteínas relacionadas con el transporte mitocondrial y con complejos relacionados con la respiración (Hsp30p, 7.08 veces más abundante en el doble mutante, Atp1p, 2 veces más abundante, Cor1p 7.09 veces más abundante, Mir1p 300 veces más abundante). Este aumento de abundancia de proteínas mitocondriales relacionadas con la respiración así como la ausencia del papel protector de las tiorredoxinas podría explicar la mayor cantidad de GSSG en el doble mutante. La menor cantidad de L-cisteinilglicina en el doble mutante podría explicar el desvío hacia la producción de precursores de aminoácidos que, como se puede observar en la Figura 4.31, están en mayor cantidad en el doble mutante.

4.4.6.8 Metabolismo del azufre

Todos los aminoácidos proteínogénicos, a excepción de la prolina, la cisteína, la glicina y la arginina están elevados en el doble mutante respecto al silvestre. En la Figura 4.32 se muestran algunos de los aminoácidos detectados por el análisis metabolómico con diferencias significativas en la abundancia entre el doble mutante en las tiorredoxinas y el silvestre. Destacar la biosíntesis de dos aminoácidos, la lisina y la metionina. Se ha descrito, que las tiorredoxinas participan en la reducción de enzimas, entre ellas la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato reductasa, o PAPS reductasa, que es requerida para la asimilación de sulfuro. Esta enzima, Met16p, es la encargada de formar sulfito a partir de PAPS (3'-fosfoadenilsulfato, fosfoadenosina fosfosulfato, 3-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, 5'-fosfoadenosina-3-fosfosulfato) gracias a las tiorredoxinas que reciclan el enzima. Este sulfito se convierte a sulfuro de hidrogeno por la sulfito reductasa dependiente de NADPH. Este sulfuro de hidrógeno (H₂S), a través de la ruta de biosíntesis de homocisteína, puede ir hacia la biosíntesis de metionina y al ciclo de la S-adenosilmetionina. De manera que la ausencia de las tiorredoxinas provoca una disminución de PAPS a través de la actividad de Met16p.

Los residuos de metionina en las proteínas son fácilmente oxidables por las ROS lo que produce metionina-s-sulfoxido y r-sulfóxidos. Estas modificaciones son reducidas a metionina a través de las enzimas antioxidantes metionina-s-sulfóxido reductasa (MsrA) y la metionina-r-sulfóxido reductasa (MsrB) (Kryukov et al., 2002). Estudios recientes revelan que la reducción de metionina sulfoxido produce la extensión de la longevidad en animales y, la delección de MsrA en ratones reduce la vida en un 40% (Moskovitz and Oien, 2010) mientras que la sobreexpresión de MsrA en el sistema nervioso central en *Drosophila melanogaster* extiende la vida alrededor de un 70% (Ruan et al., 2002). Se han realizado estudios con mutantes de las tiorredoxinas y se ha visto viendo que éstas interactúan con MsrAp. Análisis in vivo e in vitro en levaduras (Mouaheb et al., 1998) sugieren a las TRXs como reductasas que reactivan a la metionina sulfoxido reductasa, lo cual concuerda con la incapacidad del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* de crecer en placas con metionina sulfoxido como única fuente de carbono.

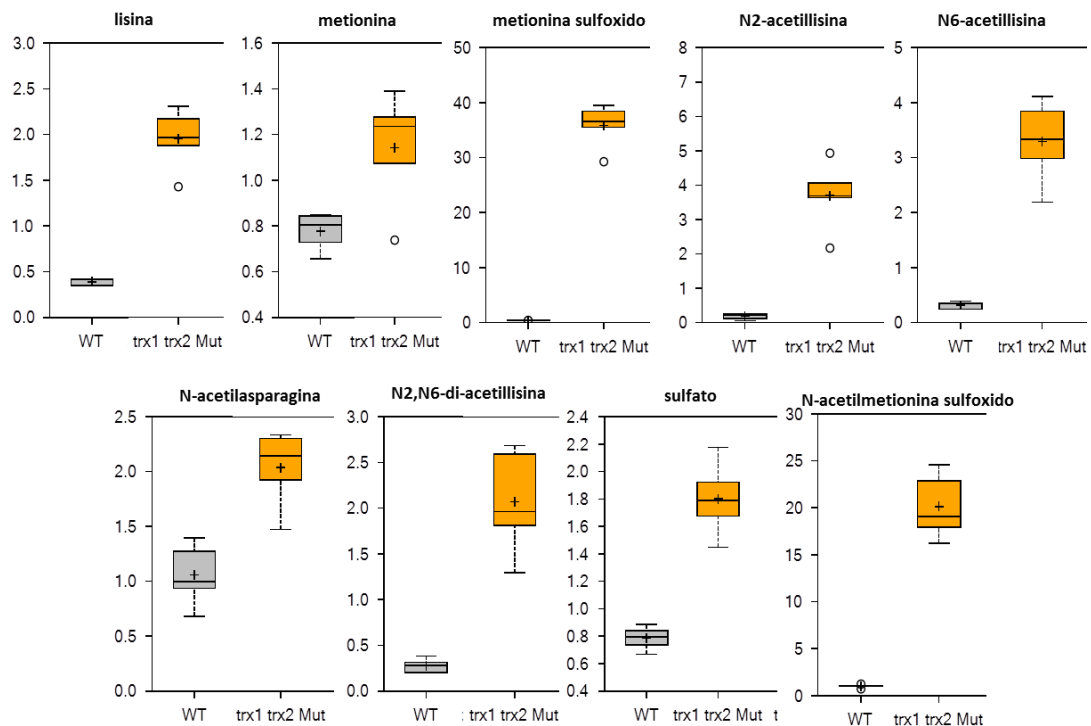


Figura 4.32 Diferencias en la producción de metabolitos de la biosíntesis de aminoácidos durante la fermentación en mosto sintético. Metabolitos implicados en la ruta con diferencias significativas entre la cepa silvestre y el doble mutante.

Nuestros datos no concuerdan con lo anteriormente descrito en la bibliografía, ya que observamos una mayor cantidad en los metabolitos implicados en la asimilación de sulfuro, viendo que hay mayor cantidad de sulfato, metionina sulfoxido y metionina en el doble mutante. Se ha demostrado que el doble mutante de las tiorredoxinas es capaz de crecer en medio conteniendo sulfato bajo condiciones que minimizan la generación de ROS, indicando la existencia de un donador de hidrógeno alternativo a la PAPS reductasa en levaduras y que las tiorredoxinas no son las únicas donadoras de hidrógeno de la PAPS reductasa (Draculic et al., 2000). Se puede concluir que las tiorredoxinas están regulando la función de muchas proteínas, como por ejemplo, la RNR y en la PAPS reductasa. Esta regulación en la PAPS reductasa ha sido ampliamente descrita por su incapacidad de asimilar sulfuro en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* en condiciones de aireación y estrés oxidativo pero sí que pueden asimilarlo en condiciones de anaerobiosis y de bajo estrés.

Estos resultados previos encajan con nuestros datos metabolómicos (Figura 4.32) en los que, como se puede observar, la mayoría de metabolitos de la ruta de biosíntesis y asimilación de sulfuro están en mayor cantidad en el doble mutante. Si las tiorredoxinas fuesen las únicas donadoras de hidrógeno para la actividad PAPS reductasa, el doble mutante debería tener menos sulfato, menos metionina sulfoxido y menos metionina. Se observa lo contrario, hay mucha más abundancia de esos metabolitos en el doble mutante que en la cepa silvestre debido a que, en condiciones de fermentación, hay poca aireación, muy baja tasa de respiración y, por tanto, poca producción de ROS, condiciones en las cuales se ha descrito que el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* es capaz de asimilar sulfuro. Otra explicación sería que el mosto sintético es un medio complejo y con fuentes de azufre asimilables de manera que, el doble mutante podría reservar dichas fuentes y producir mayor cantidad de metabolitos de esta ruta.

4.5 Comparación entre el análisis del metaboloma del *trx1Δtrx2Δ* y *trr1Δ*

Se realizó también un análisis comparativo entre el metaboloma del doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas y el del mutante de la tiorredoxina reductasa citosólica para estudiar las diferencias entre ambas cepas ya que, a lo largo de todo este trabajo, se han observado diferencias bioquímicas y funcionales entre ambos mutantes. Los resultados se muestran en forma de mapas de color (*heatmaps*) utilizando el programa MeV (Al et al., 2003) para analizar el impacto sobre diversas rutas metabólicas de interés biotecnológico. Se muestra el *heat map* obtenido mediante el análisis de la abundancia de los metabolitos detectados en el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* frente la cepa silvestre (columna 1), el mutante *trr1Δ* frente a la cepa silvestre (columna 2) y la comparación entre la abundancia de los metabolitos en *trr1Δ* frente al doble mutante *trx1Δtrx2Δ* (columna 3). En la parte superior de los *heatmaps* hay un gradiente de abundancia de manera que los metabolitos en negro son los que no presentan diferencias entre las cepas a comparar, en verde los que presentan los metabolitos que se encuentran en menor abundancia y en rojo los que presentan abundancias superiores en el doble mutante frente a la cepa silvestre.

Los datos más relevantes para la fermentación alcohólica son los del metabolismo de carbohidratos, que se muestra en la Figura 4.33. El impacto de la delección de las tiorredoxinas es sutil, y se incrementa algo más en el caso de la delección de *TRR1*. Contrariamente, la inducción del metabolismo lipídico es mayor en el caso del doble mutante *trx1Δtrx2Δ* que en el mutante *trr1Δ*, Figura 4.36.

En la Figura 4.34, se observan los metabolitos de nucleótidos. Como se ha comentado en la Figura 4.23, el doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas tiene un aumento en los metabolitos de la biosíntesis de nucleótidos con respecto a la cepa silvestre, dato que se ve reflejado en el análisis mediante construcción de *heat maps*, ya que la mayoría de metabolitos se encuentran coloreados de rojo (aumentados 5 veces). No hay tantas diferencias en el caso del mutante *trr1Δ* frente a la cepa silvestre. En cuanto a los metabolitos cofactores (NAD,

FAD, etc.), hay una similitud en la abundancia de algunos de ellos entre el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* y la cepa silvestre y el mutante *trr1Δ* y la cepa silvestre.

En cuanto al metabolismo de los lípidos, Figura 4.36 destacar el papel de las tiorredoxinas citosólicas, y no de la tiorredoxina reductasa 1, en el metabolismo de lípidos. Como hemos comentado en este capítulo, el doble mutante *trx1Δtrx2Δ* tiene 4 veces más abundante la desaturasa Ole1p así como la mayoría de metabolitos de la biosíntesis de ácidos grasos. En la Figura 4.37 en la parte A se muestran los heat maps de metabolitos correspondientes a péptidos y en la parte B a metabolitos del metabolismo secundario y xenobióticos.

En cuanto a los como péptidos, Figura 4.37 A, se observan diferencias entre las cepas de estudio empleando un valor máximo de 3 veces. Como se puede observar, el doble mutante presenta una abundancia tres veces superior del metabolito fenilalanilalanina y leucilglutamina (señalado con una fecha) frente a la cepa silvestre, lo que difiere de la comparación del mutante *trr1Δ* frente a la cepa silvestre. En el caso de los metabolitos secundarios y xenobióticos, se observan que hay diferencias en el caso del harmano, alcaloide derivado del triptófano, en el que el doble mutante tiene 5 veces más abundancia de este metabolito con respecto a la cepa silvestre mientras que el mutante *trr1Δ* no presenta diferencias. Otro metabolito, el benzoato, se encuentra en ambas cepas mutantes aumentada su abundancia alrededor de 5 veces más que en la cepa silvestre.

Lo que se puede concluir de esta sección del Capítulo 4 es que la delección de las dos tiorredoxinas citosólicas y la delección de la tiorredoxina reductasa no producen el mismo fenotipo. A lo largo del Capítulo 3 y 4 hemos visto diferencias en comportamientos entre *trx1Δtrx2Δ* y *trr1Δ* así como posibles funciones de *trr1Δ* o como posibles donadores de electrones alternativos en el caso de *trx1Δtrx2Δ*.

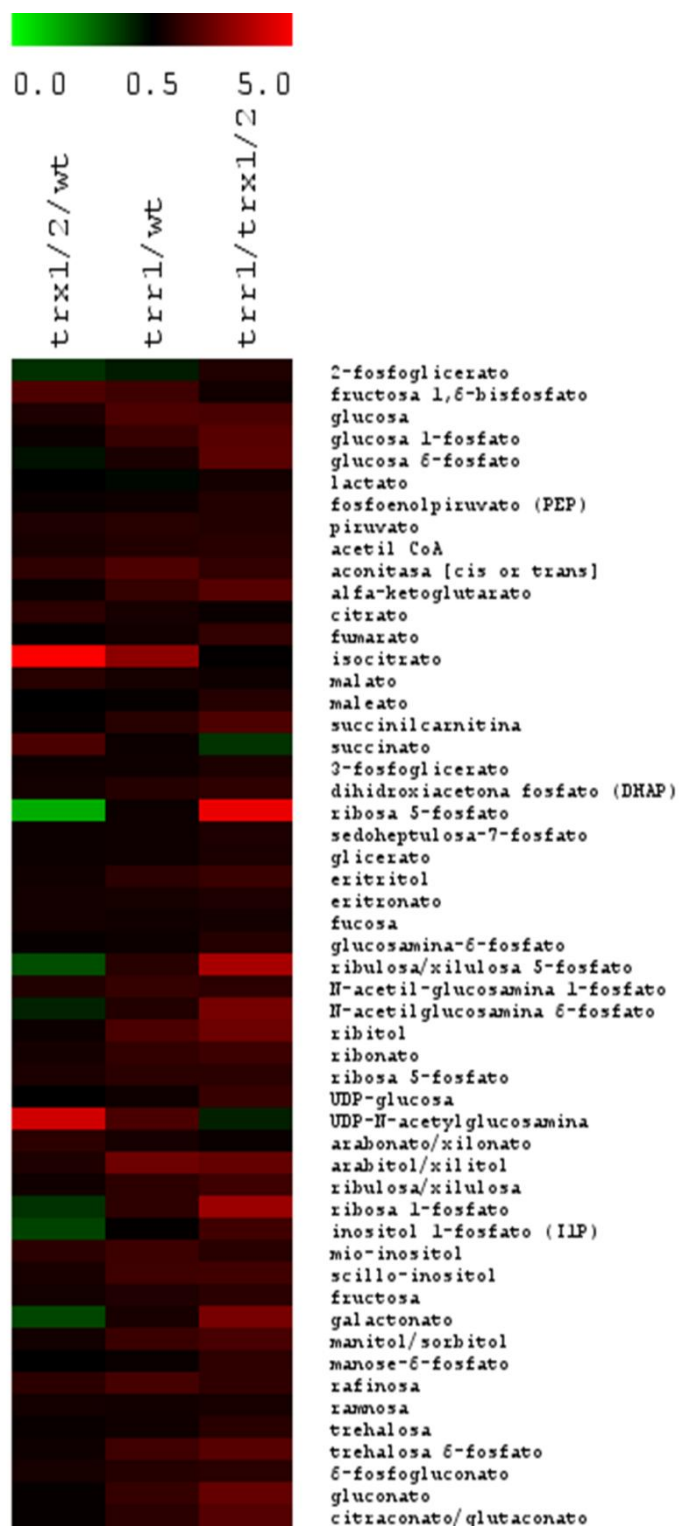


Figura 4.33 Análisis comparativo del metaboloma del mutante doble de las tiorredoxinas y el mutante de la tiorredoxina reductasa 1 en crecimiento en mosto sintético. *Heat map* de carbohidratos.

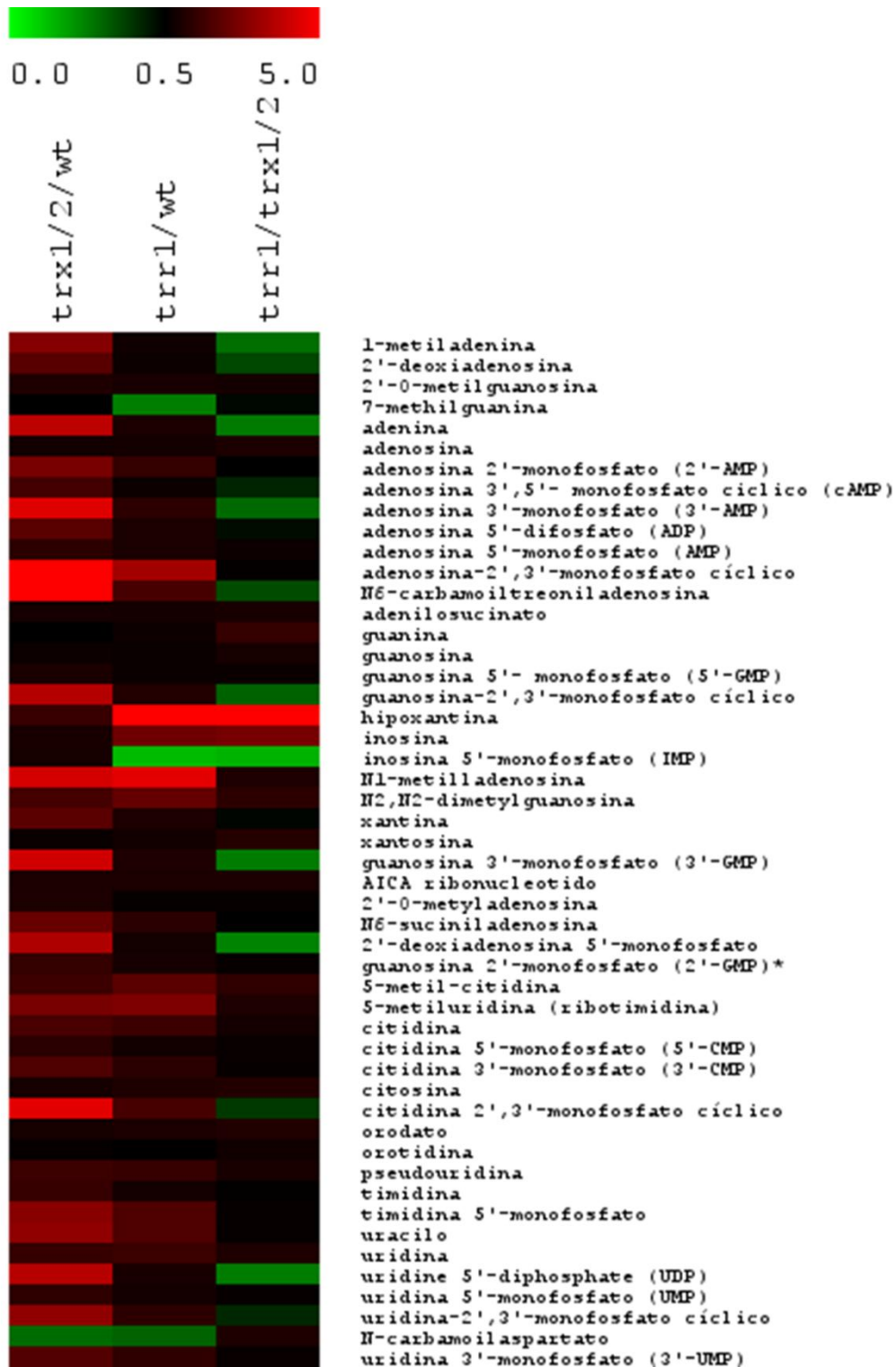


Figura 4.34 Análisis comparativo del metaboloma del mutante doble de las tiorredoxinas y el mutante de la tiorredoxina reductasa 1 en crecimiento en mosto sintético. *Heat map* de nucleótidos.

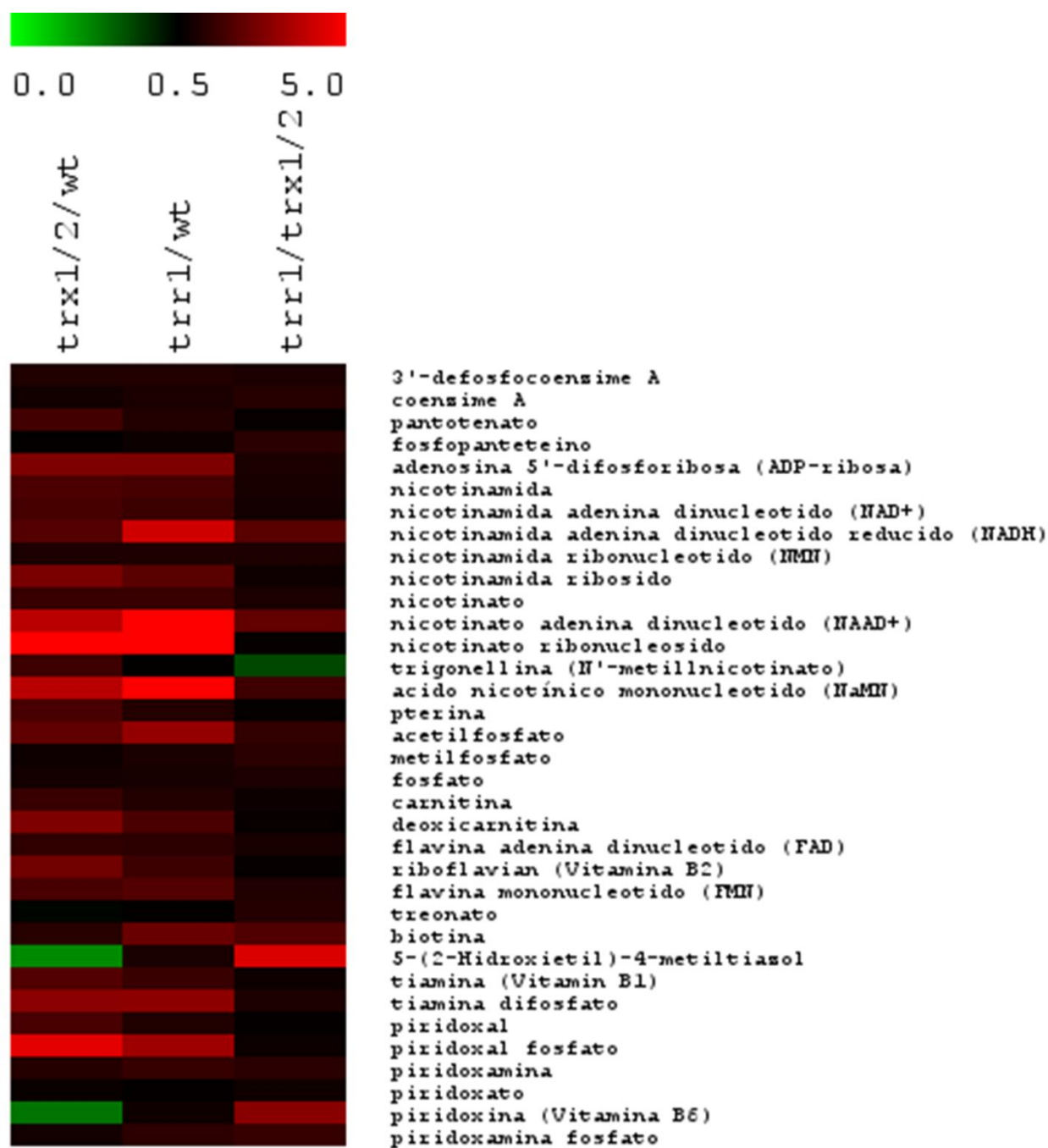


Figura 4.35 Análisis comparativo del metaboloma del mutante doble de las tiorredoxinas y el mutante de la tiorredoxina reductasa 1 en crecimiento en mosto sintético. *Heat map* de cofactores.

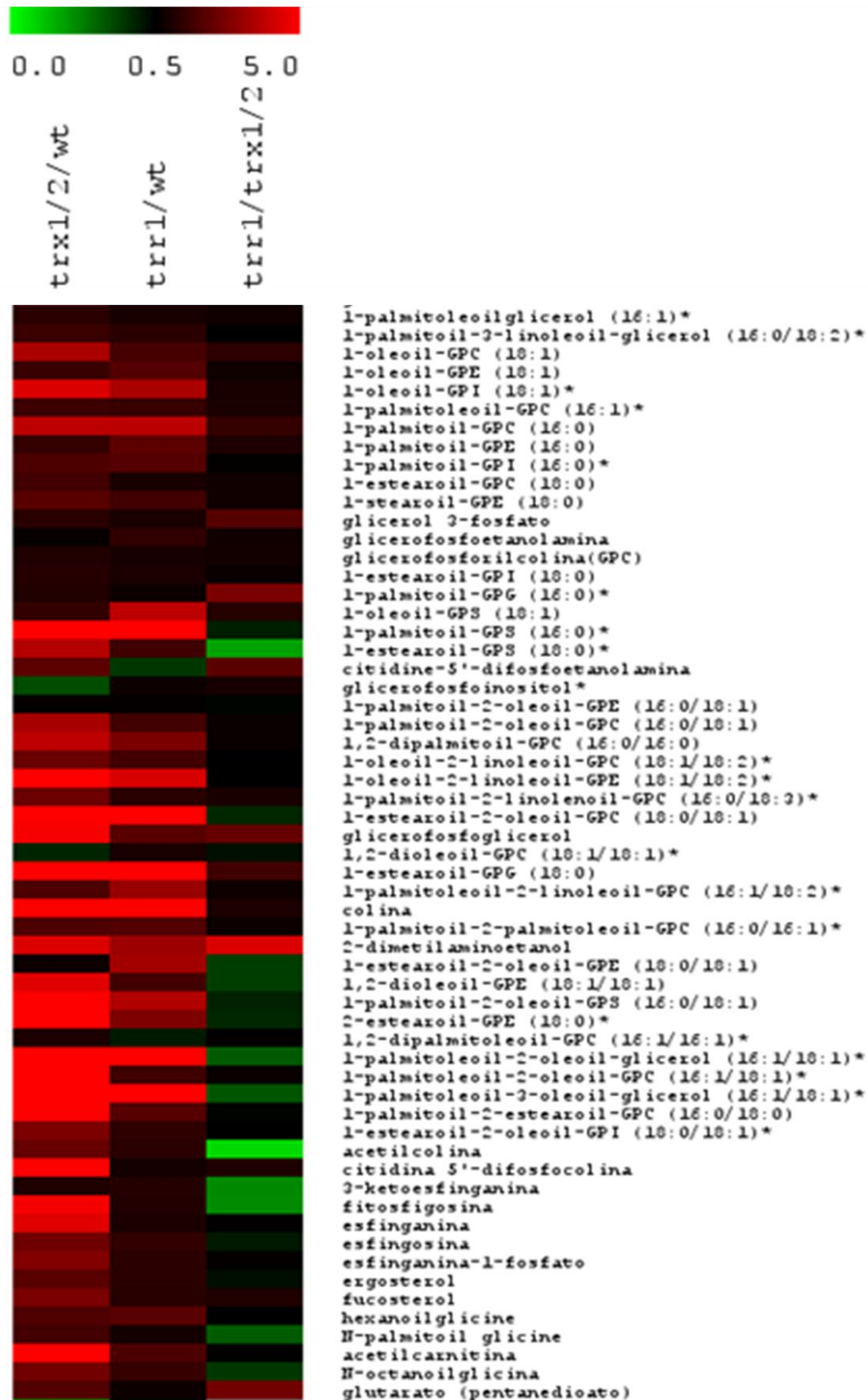


Figura 4.36 Continuación. Análisis comparativo del metaboloma del mutante doble de las tiorredoxinas y el mutante de la tiorredoxina reductasa 1 en crecimiento en mosto sintético. *Heat map* de lípidos.

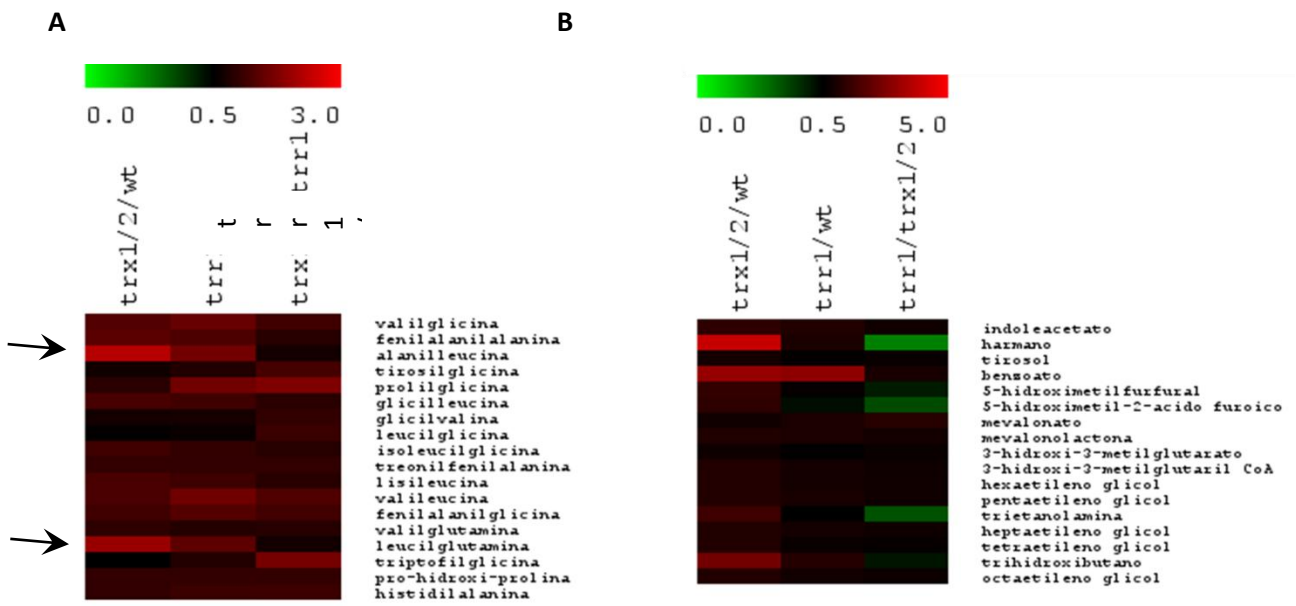


Figura 4.37 Análisis comparativo del metaboloma del mutante doble de las tiorredoxinas y el mutante de la tiorredoxina reductasa 1 en crecimiento en mosto sintético. Heat map de péptidos (A) y heat map de metabolitos secundarios y xenobióticos (B).

En este capítulo, se ha estudiado el papel de las tiorredoxinas citosólicas en el envejecimiento cronológico en diferentes medios. Se ha observado una disminución en la LC en el doble mutante en el medio SC (Figura 4.3) que se podría explicar con la deficiencia del doble mutante para hacer frente al estrés tanto oxidativo como reductor (Figura 4.1). A pesar de tener niveles más altos de glutatión tanto en exponencial y estacionario así como niveles altos de catalasa en estacionario (Figura 4.2), estos mecanismos antioxidantes alternativos no consiguen compensar este defecto de viabilidad. De manera similar hemos observado en el Capítulo 3, que el mutante *trr1Δ* tiene una viabilidad reducida en SC (Figura 3.6F). Sin embargo, en mosto, tanto sintético como natural, el doble mutante tiene un crecimiento ralentizado y una menor velocidad de consumo de los azúcares y a diferencia de lo que ocurría con *trr1Δ* (Figura 3.6 B), en el doble mutante de las tiorredoxinas este menor metabolismo se traduce en una extensión importante de la LC (Figura 4.4 y 4.5). Se realizó un análisis proteómico y metabolómico del doble mutante en diferentes medios de crecimiento (SC, YPD, MS300) así como en diferentes estados de crecimiento (exponencial y estacionario) y análisis del proteoma tiólico redox y análisis de metabolitos durante crecimiento en MS300, respectivamente. Uno de los motivos por lo que tiene un metabolismo más lento podría ser explicado por una menor abundancia en las proteínas de la glicólisis en el doble mutante (Figura 4.16) que hace que tenga una producción de metabolitos de la glucólisis diferente a la cepa silvestre (Figura 4.17). Se ha comprobado esta diferencia de crecimiento en mosto sintético mediante análisis de la densidad óptica con placas multipocillo (Figura 4.18) y mediante la medida de la capacidad fermentativa (Figura 4.21), que es menor por célula en el doble mutante de las tiorredoxinas. Otras rutas metabólicas están alteradas y podrían contribuir a este defecto en el crecimiento, como por ejemplo la biosíntesis de ácidos nucleicos (Figura 4.25 y Figura 4.26) en los que se observa, de manera general, un aumento de las bases nitrogenadas en el doble mutante que se podrían interpretar como el defecto que tiene el *trx1Δtrx2Δ* en la actividad de la ribonucleótido reductasa que hace que hay un defecto en la producción de dNTPs y que las células detengan su ciclo celular en la fase S del ciclo. Además, se ha observado un aumento en la cantidad de los metabolitos relacionados con el dinucleótido NAD/NADH (Figura 4.27), lo que podría indicar una alteración en el estado energético de la célula.

Aumenta tanto la forma oxidada como la reducida, lo cual sugiere que no hay un cambio en el estado redox que lo altere. Lamentablemente los datos metabolómicos no nos dan información sobre el estado redox de la forma fosforilada, el NADP(H), que es el donador de poder reductor del sistema. El aumento de la cantidad de NAD⁺ podría suponer el aumento de actividad de unas proteínas muy relacionadas con longevidad, las sirtuinas. Las sirtuinas, como Sir2p, son desacetilasas dependientes de NAD⁺ cuya acción promueve la condensación de la cromatina, la estabilidad genómica y la longevidad. El aumento de NAD⁺ estimularía su función y podría contribuir a la extensión de LC, pero el aumento de la nicotinamida, que es el producto de su reacción y que la inhibe en un mecanismo de feedback, la disminuiría, con el consiguiente efecto en longevidad (Anderson et al., 2003).

Resultados y Discusión

En estos estudios proteómicos se ha detectado una abundancia de cuatro veces más de la desaturasa Ole1p, la única de la levadura, en el doble mutante que correlaciona con un aumento en la biosíntesis de ácidos grasos en los estudios metabolómicos (Figura 4.29). Estos resultados podrían indicar que debido al defecto en la división celular, provoca un aumento en la concentración de ácidos grasos que desencadenaría la síntesis de Ole1p. Mediante un análisis comparativo con la construcción de *heats maps* (Figura 4.36) se puede observar que ciertas diferencias en el metabolismo de los ácidos grasos son características del mutante *trx1Δtrx2Δ*. Numerosos trabajos describen el papel de las tiorredoxinas citosólicas como las reductoras de la enzima PAPS reductasa, de manera que el mutante *trx1Δtrx2Δ* tiene un defecto en la actividad de este enzima siendo auxótrofo para la metionina por lo que tiene un defecto en la asimilación de azufre. En nuestros análisis metabolómicos en mosto sintético, se ha observado que el *trx1Δtrx2Δ* no parece tener un defecto en esta ruta, ya que el doble mutante presenta niveles aumentados desde el sulfato hasta la metionina (Figura 4.32). Estos resultados podrían indicar por un lado, que durante el crecimiento en mosto sintético la levadura acumula moléculas que contienen azufre del medio y que más tarde lo utiliza, con lo cual no requiere la ruta de asimilación de azufre inorgánico o que, el doble mutante es capaz de asimilar el azufre en condiciones de baja aireación y bajo estrés oxidativo como ya se ha descrito anteriormente y que esto indicaría que la PAPS reductasa tendría un donador de electrones alternativo.

Los resultados del análisis del proteoma tiorredox nos permiten detectar siete proteínas que contienen péptidos redox (Figura 4.1). En medio SC fase estacionaria las proteínas que contienen péptidos redox están vinculadas a la mitocondria. En fase estacionaria las células vienen de un metabolismo respiratorio y por lo tanto son más propensas a acumular ROS producidos en la mitocondria, que en el mutante *trx1Δtrx2Δ* no serían eliminadas completamente y esto podría producir un daño oxidativo a nivel molecular. Las tiorredoxinas citosólicas podrían modular la reducción/oxidación de la cisteína 57 de la proteína Crp3p y la cisteína 27 de la proteína Gre3p ya que estas cisteínas se encuentran más oxidadas en el doble mutante que en la cepa silvestre. En crecimiento exponencial, YPD y SC exponencial, las células se están dividiendo y las proteínas detectadas con péptidos redox son proteínas ribosomales. La reducción/oxidación de las cisteínas de estas proteínas no sigue un patrón común.

En todos los medios ensayados (SC, YPD y Mosto) así como en las dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) se ha detectado la cisteína 146 de la superóxido dismutasa 1, Sod1p (Tabla 4.1). En condiciones de crecimiento exponencial en YPD y SC y crecimiento en mosto la cisteína 146 de Sod1p se encuentra más oxidada en el doble mutante que en la cepa silvestre. En condiciones estacionarias la cisteína 146 se encuentra más reducida en el doble mutante que en el silvestre. Se realizó estudios de la actividad de la superóxido dismutasa mediante zimogramas en el doble mutante de las tiorredoxinas y los mutantes *trr1Δ* y *tsa1Δ* para tener otras proteínas relacionadas con la respuesta a estrés como control (Figura 4.7). Se observó que a pesar de haber detectado la cisteína 146 de la Sod1p más oxidada en el doble mutante en exponencial y más reducida en estacionario, la actividad de la SOD (tanto 1 como 2) era mayor en el *trx1Δtrx2Δ* y en el *trr1Δ*. Estos resultados no encajan con datos previos que afirman que el puente disulfuro entre la cisteína 146 y la 57 de Sod1p es necesario para la actividad de la Sod1p.

Se estudió si los resultados obtenidos se podrían explicar mediante el papel de las tiorredoxinas como deglutationiladoras (Figura 4.9 y 4.10). Se observó que en todas las condiciones ensayadas había glutatión unido a la Sod1p y que al menos en medios con 2% de glucosa no eran dependientes de las tiorredoxinas pero sí que había menos glutatión en la fase estacionaria (Figura 4.9), al contrario de lo esperado para proteínas con actividad deglutationiladoras. En mosto también había glutatión unido a la proteína y a día 6 de crecimiento en este medio hay una menor glutatión en el *trx1Δtrx2Δ*. Así pues, Sod1p no sería una diana de deglutatión por parte de las tiorredoxinas.

En los estudios proteómicos globales y el análisis posterior de comparación de medios y/o fases de crecimiento nos permite observar la adaptación o el intento de compensación del *trx1Δtrx2Δ* al medio. Por ejemplo, si comparamos las proteínas comunes detectadas como significativas entre el crecimiento en YPD exponencial y en SC exponencial se observan que hay un aumento en la abundancia en el doble mutante de las proteínas de respuesta a estrés oxidativo como Tsa1p, Sod1p y Srx1p y también un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con el daño al DNA como Ddr48 y aumento de la abundancia de la ribonucleótido reductasa.

En general, los resultados obtenidos en este capítulo permiten observar los diferentes mecanismos de adaptación y/o compensación que tienen las células en ausencia de las tiorredoxinas citosólicas que son, como se ha descrito a lo largo del Capítulo 3 y 4, importantes como moléculas de protección frente al estrés oxidativo y otros tipos de estrés así como su papel en la regulación de las proteínas a través de la modificación postraducciona glutatión, en los diferentes medios de crecimiento y que, muchos de estos mecanismos difieren de la cepa mutante *trr1Δ* indicando funciones diferenciadas entre ambas proteínas.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La integridad del complejo SAGA es necesaria para la extensión de la longevidad cronológica así como para la autofagia en condiciones de ayuno de nitrógeno y la respiración. De las dos actividades enzimáticas del complejo SAGA estudiadas, la acetiltransferasa Gcn5p es determinante para la longevidad y para la inducción de la autofagia pero no lo es tanto la actividad de desubiquitinización.
2. El papel de la acetiltransferasa Gcn5p en LC está conectado con la función de la ruta TORC1 en el control del envejecimiento en función de la disponibilidad de nutrientes, como demuestra la inhibición parcial de la extensión de la longevidad de los mutantes *tor1Δ* y *sch9Δ* en ausencia de Gcn5p. Además la actividad acetiltransferasa Gcn5p también establece conexión entre SAGA y la respuesta retrógrada.
3. La mitocondria juega un papel relevante en la longevidad cronológica, tanto por la función respiratoria como por los mecanismos reguladores de la ruta retrógrada que permiten la señalización al núcleo del estado mitocondrial. Este papel se hace crítico en condiciones de metabolismo respiratorio y de estrés oxidativo y se pone en evidencia en los fenotipos de longevidad cronológica de mutantes *petite* y de mutantes en componentes de la ruta retrógrada, así como en el comportamiento de híbridos interespecíficos de *S. cerevisiae* y *S. uvarum* con dotación mitocondrial diferencial, en los que se observa la importancia de DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* en la resistencia al estrés oxidativo y en la extensión de la LC.
4. Existe una conexión entre la peroxirredoxina citoplasmática Tsa1p y el control general de aminoácidos, GAAC, a través de la quinasa Gcn2p que afecta al crecimiento y a la supervivencia en fase estacionaria debido a un defecto en la respiración y en la correcta represión por glucosa.
5. El estudio del sistema tiorredoxina ha permitido detectar una nueva función de la tiorredoxina reductasa en la regulación de la disponibilidad de nutrientes de manera relacionada con ruta TORC1. La disminución de actividad de la ruta en los mutantes *trr1Δ* da lugar a una mayor sensibilidad a rapamicina y a una disminución de la autofagia, posiblemente debido a su interacción con el complejo TORC1 a través de su GTPasa Gtr1p.

6. En el estudio proteómico y metabolómico mediante el uso del doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas ha permitido describir rutas metabólicas afectadas en el doble mutante, como es la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y, la glicólisis, y también la ruta de salvamento de la nicotinamida, lo que conjuntamente explica las necesidades de mecanismos de compensación en el mutante para hacer frente a los diferentes tipos de estrés.

7. El análisis del proteoma tiólico redox comparado entre el doble mutante de las tiorredoxinas citosólicas y la cepa silvestre ha permitido la detección de siete proteínas con cisteínas susceptibles de oxidación reversible, en su mayoría proteínas ribosomales, lo que refleja el defecto de crecimiento del doble mutante. Entre las otras proteínas susceptibles de oxidación reversible detectadas diferencialmente oxidadas en el mutante de las tiorredoxinas citosólicas se encuentra también la superóxido dismutasa Sod1p que no muestra, sin embargo, diferencias en el estado de glutationilación respecto de al cepa silvestre, lo que sugiere que no son las tiorredoxinas las responsables de su desglutinationilación.

8. El análisis comparativo de los datos metabolómicos del doble mutante en las tiorredoxinas citosólicas, del mutante en la tiorredoxina reductasa y de la cepa silvestre, corroboran la significativa diferencia de los fenotipos observados en esos dos mutantes, diferencia que se ha descrito a lo largo del Capítulo 3 y 4 de esta tesis, y que indica que las tiorredoxinas citosólicas han de tener donadores de electrones alternativos a la tiorredoxina reductasa y que la tiorredoxina reductasa ha de tener otras funciones, sobre sustratos diferentes a las tiorredoxinas que hasta la fecha son desconocidos.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abdel-Ghany, S. E., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Andres-Colas, N., Bodecker, J. R., Puig, S., et al. (2008). Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. *J Biol Chem* 6, 5839–5846. doi:10.1021/jf060851b.
- Adams, A., and Kaiser, C. (1998). *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, N.Y.
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nyström, T. (2003). Asymmetric Inheritance of Oxidatively Damaged Proteins During Cytokinesis. *Science (80-.)*. 299, 1751–1753. doi:10.1126/science.1080418.
- Aguilera, J., and Prieto, J. A. (2004). Yeast cells display a regulatory mechanism in response to methylglyoxal. 4, 633–641. doi:10.1016/j.femsyr.2003.12.007.
- Ahn, S., and Thiele, D. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17, 516–528. doi:10.1101/gad.1044503.ors.
- Al, S., V, S., J, W., J, L., W, L., N, B., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374–8.
- Airoldi, E. M., Miller, D., Athanasiadou, R., Brandt, N., Abdul-Rahman, F., Neymotin, B., et al. (2016). Steady-state and dynamic gene expression programs in *Saccharomyces cerevisiae* in response to variation in environmental nitrogen. *Mol. Biol. Cell* 27, 1–38. doi:10.1091/mbc.E14-05-1013.
- Albertin, W., da Silva, T., Rigoulet, M., Salin, B., Masneuf-Pomarede, I., de Vienne, D., et al. (2013). The Mitochondrial Genome Impacts Respiration but Not Fermentation in Interspecific *Saccharomyces* Hybrids. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0075121.
- 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.
- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., et al. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J. Cell Biol.* 174, 89–100. doi:10.1083/jcb.200604072.
- Alvers, A. L., Wood, M. S., Hu, D., Kaywell, A. C., Dunn, W. A., and Aris, J. P. (2009). Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy* 5, 847–849. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00469.x.question.
- Amerine, M. A. (1960). *The Technology of Winemaking*. The AVI Publishing Company Inc., Connecticut.
- Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., and Sinclair, D. A. (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423, 181–185. doi:10.1038/nature01578.
- Andersson, V., Hanzén, S., Liu, B., Molin, M., and Nyström, T. (2013). Enhancing protein disaggregation restores proteasome activity in aged cells. *Aging (Albany, NY)*. 5, 802–812.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M., and Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and

- GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* 16, 2179–2187. doi:10.1093/emboj/16.9.2179.
- Auesukaree, C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* xx, 1–10. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.03.009.
- Ayer, A., Gourlay, C. W., and Dawes, I. W. (2014). Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. 14, 60–72. doi:10.1111/1567-1364.12114.
- B, H., and JM, G. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246, 501–514.
- Bakalinsky, A. T., and Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 367–382. doi:10.1002/yea.320060503.
- Barnett, J. A. (2000). A history of research on yeasts 02: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* 16, 755–771. doi:10.1002/1097-0061(20000615)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4.
- Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., et al. (2004). Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: Implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* 279, 47939–47951. doi:10.1074/jbc.M408011200.
- Beevers, C. S., Chen, L., Liu, L., Luo, Y., Webster, N. J. G., and Huang, S. (2009). Curcumin disrupts the mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer Res.* 69, 1000–1008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2367.
- Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S., and Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22, 1–7. doi:10.1007/BF00351734.
- Biswas, S., Chida, A. S., and Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.* 71, 551–564. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.044.
- Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–4. doi:10.1038/nature02079.1.
- Bito, A., Haider, M., Hadler, I., and Breitenbach, M. (1997). Identification and Phenotypic Analysis of Two Glyoxalase II Encoding Genes from *Saccharomyces cerevisiae*, GLO2 and GLO4, and Intracellular Localization of the Corresponding Proteins *. *J. Biol. Chem.* 272, 21509–21519.
- Bodvard, K., Peeters, K., Roger, F., Romanov, N., Igbaria, A., Welkenhuysen, N., et al. (2017). Light-sensing via hydrogen peroxide and a peroxiredoxin. *Nat. Commun.* 8, 14791. doi:10.1038/ncomms14791.
- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., and De Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA Synthetase Controls TORC1 via the EGO Complex. *Mol. Cell* 46, 105–110. doi:10.1016/j.molcel.2012.02.009.
- Borneman, A. R., and Pretorius, I. S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu*

Bibliografía

- stricto complex. *Genetics* 199, 281–291. doi:10.1534/genetics.114.173633.
- Borneman, A. R., Schmidt, S. A., and Pretorius, I. S. (2013). At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends Genet.* 29, 263–271. doi:10.1016/j.tig.2012.10.014.
- 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, 248–254. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- Brandes, N., Tienson, H., Lindemann, A., Vitvitsky, V., Reichmann, D., Banerjee, R., et al. (2013). Time line of redox events in aging postmitotic cells. *Elife* 2013, 1–18. doi:10.7554/eLife.00306.
- Brasil, A. A., Belati, A., Mannarino, S. C., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A., and Pereira, M. D. (2013). The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells. *FEMS Yeast Res.* 13, 433–440. doi:10.1111/1567-1364.12045.
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 192, 73–105. doi:10.1534/genetics.111.135731.
- Brown, C. E. (2001). Recruitment of HAT Complexes by Direct Activator Interactions with the ATM-Related Tra1 Subunit. *Science (80-.)*. 292, 2333–2337. doi:10.1126/science.1060214.
- Buchan, J. R., Muhlrad, D., and Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 183, 441–455. doi:10.1083/jcb.200807043.
- Bukowski, M. R., Bucklin, C., and Picklo, M. J. (2015). Quantitation of protein S-glutathionylation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Correction for contaminating glutathione and glutathione disulfide. *Anal. Biochem.* 469, 54–64. doi:10.1016/j.ab.2014.10.002.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J. L. (2003). Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 531, 5–23. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.09.001.
- Calvo, I., Gavrielli, N., Iglesias-Baena, I., Garcı, S., Hoe, K.-L., Kim, D. U., et al. (2009). Genome-Wide Screen of Genes Required for Caffeine Tolerance in Fission Yeast. *PLoS One* 4. doi:10.1371/journal.pone.0006619.
- Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., and Virgilio, C. De (2004). The Novel Yeast PAS Kinase Rim15 Orchestrates G 0 -Associated Antioxidant Defense Mechanisms Brief Report. *Cell Cycle* 4101, 462–468. doi:10.4161/cc.3.4.791.
- 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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.043.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 202–207. doi:10.1016/S1369-5274(99)80035-6.
- Carlson, M., Osmond, B. C., and Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98, 25–40.

- Carrascosa, A., Muñoz, R., and González, R. (2005). *Microbiología del vino*. AMV ediciones.
- Carter, B. P. G. C. and B. L. A. (1986). t-factor enhancement of hybrid formation by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* II. *Curr. Genet.* 10, 943–945. doi:10.1097/00006205-199702000-00013.
- Castor, J. G. B. (1953). The B-complex Vitamins of Musts and Wines Growth Factors Microbial. *Appl. Microbiol.* 1, 97–102.
- Cebollero, E., and Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 1413–1421. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.008.
- Cha, M. K., Choi, Y. S., Hong, S. K., Kim, W. C., No, K. T., and Kim, I. H. (2003). Nuclear Thiol Peroxidase as a Functional Alkyl-hydroperoxide Reductase Necessary for Stationary Phase Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 24636–24643. doi:10.1074/jbc.M302628200.
- Charoenbhakdi, S., Dokpikul, T., Burphan, T., Techo, T., and Auesukaree, C. (2016). Vacuolar H⁺-ATPase protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against ethanolinduced oxidative and cell wall stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3121–3130. doi:10.1128/AEM.00376-16.
- Chen, J. C. Y., and Powers, T. (2006). Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 49, 281–293. doi:10.1007/s00294-005-0055-9.
- Cherkasova, V. A., and Hinnebusch, A. G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes Dev.* 17, 859–872. doi:10.1101/gad.1069003.
- Chumnanpuen, P., Zhang, J., Nookaew, I., and Nielsen, J. (2012). Integrated analysis of transcriptome and lipid profiling reveals the co-influences of inositol-choline and Snf1 in controlling lipid biosynthesis in yeast. *Mol. Genet. Genomics* 287, 541–554. doi:10.1007/s00438-012-0697-5.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123–133. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
- Codón, A. C., Gasent-Ramírez, J. M., and Benítez, T. (1994). Factors Which Affect the Frequency of Sporulation and Tetrad Formation in *Saccharomyces-Cerevisiae* Bakers Yeasts. 61, 630–638.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., et al. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1055–1061. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02540.x.
- Comitini, F., Mirko, G., Paola, D., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentati. *Food Microbiol.* 28, 873–882. doi:10.1016/j.fm.2014.05.007.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., and Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 254–299. doi:10.1111/1574-6976.12065.

Bibliografía

- Cooper, A. J., Pinto, J. T., and Callery, P. S. (2011). Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 891–910. doi:10.1517/17425255.2011.577738.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6784–6789. doi:10.1073/pnas.102687599.
- Culotta, V. C., Yang, M., and O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 747–758. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.003.
- Cummings, N. E., and Lamming, D. W. (2016). Regulation of metabolic health and aging by nutrient-sensitive signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1–10. doi:10.1016/j.mce.2016.11.014.
- Cunningham, G. M., Roman, M. G., Flores, L. C., Hubbard, G. B., Salmon, A. B., Zhang, Y., et al. (2015). The paradoxical role of thioredoxin on oxidative stress and aging. *Arch. Biochem. Biophys.* 576, 32–38. doi:10.1016/j.abb.2015.02.025.
- Da Silva, T., Albertin, W., Dillmann, C., Bely, M., La Guerche, S., Giraud, C., et al. (2015). Hybridization within *Saccharomyces* genus results in homeostasis and phenotypic novelty in winemaking conditions. *PLoS One* 10, 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0123834.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., and Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 883–898. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014.
- Dames, S. A., Mulet, J. M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M. N., and Grzesiek, S. (2005). The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J. Biol. Chem.* 280, 20558–20564. doi:10.1074/jbc.M501116200.
- Daniel, J. A., and Grant, P. A. (2007). Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 618, 135–148. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.09.008.
- Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H., and Schiestl, R. H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5116–5121. doi:10.1073/pnas.93.10.5116.
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31. doi:10.1042/bss0610001.
- del Pozo, L., Abarca, D., Claros, M. G., and Jiménez, A. (1991). Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Curr. Genet.* 19, 353–358. doi:10.1007/BF00309595.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481. doi:10.1016/S0092-8674(02)01048-6.
- Delneri, D., Tomlin, G. C., Wixon, J. L., Hutter, A., Sefton, M., Louis, E. J., et al. (2000). Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene* 252, 127–135.

- Desideri, E., Filomeni, G., and Ciriolo, M. R. (2012). Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells. *Autophagy* 12, 1769–1781.
- Dever, T. E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108, 545–556. doi:10.1016/S0092-8674(02)00642-6.
- Dihazi, H., Kessler, R., and Eschrich, K. (2003). Glucose-induced stimulation of the Ras-cAMP pathway in yeast leads to multiple phosphorylations and activation of 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochemistry* 42, 6275–6282. doi:10.1021/bi034167r.
- Doi, M., Cha, M., Choi, Y., Hong, S., Kim, W., No, K. T., et al. (2003). Nuclear Thiol Peroxidase as a Functional Alkyl-hydroperoxide Reductase Necessary for Stationary Phase Growth of *Saccharomyces cerevisiae* *. *J. Biol. Chem.* 278, 24636–24643. doi:10.1074/jbc.M302628200.
- Draculic, T., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2000). A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 36, 1167–1174.
- Dunn, E. A., Weaver, L. C., Dekaban, G. A., and Foster, P. J. (2005). Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics* 6, 53–62. doi:10.1186/1471-2164-6-53.
- Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J. M., and Deponte, M. (2009). Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *saccharomyces cerevisiae*: The catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry* 48, 1410–1423. doi:10.1021/bi801859b.
- Egilmez, N. K., and Jazwinski, S. M. (1989). Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171, 37–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644196>.
- Elliott, B., Haltiwanger, R. S., and Futcher, B. (1996). Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144, 923–933.
- Erjavec, N., Cvijovic, M., Klipp, E., and Nyström, T. (2008). Selective benefits of damage partitioning in unicellular systems and its effects on aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18764–18769. doi:10.1073/pnas.0804550105.
- Erjavec, N., and Nyström, T. (2007). Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10877–81. doi:10.1073/pnas.0701634104.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., and Querol, A. (2010). The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1, 143–148. doi:10.2436/im.v1i2.59.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 469–486. doi:10.1016/S0168-6445(00)00035-8.
- Fabrizio, P. (2001). Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science* (80-.). 292, 288–290. doi:10.1126/science.1059497.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L. L., Diaspro, A., et al. (2004a). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell*

Bibliografia

- Biol* 166, 1055–1067. doi:10.1083/jcb.200404002.
- Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., et al. (2005). Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* 123, 655–667. doi:10.1016/j.cell.2005.08.042.
- Fabrizio, P., Liou, L. L., Moy, V. N., Diaspro, A., Valentine, J. S., Gralla, E. B., et al. (2003). SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* 163, 35–46.
- Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2003a). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2, 73–81.
- Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2003b). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 371, 89–95. doi:10.1007/978-1-59745-361-5_8.
- Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783, 1280–1285. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.017.
- 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, 136–142.
- Fernandes, A. R., Dur??o, P. J., Santos, P. M., and S??-Correia, I. (2003). Activation and significance of vacuolar H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* adaptation and resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1317–1324. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.072.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., and Silver, P. A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin ?? homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* 17, 5606–5614. doi:10.1093/emboj/17.19.5606.
- Filipits, M., Simon, M. M., Rapatz, W., Hamilton, B., and Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene* 132, 49–55. doi:10.1016/0378-1119(93)90513-3.
- Fleet, G. H. (1998). “*The microbiology of alcoholic beverages,*” in *Microbiology of Fermented Foods*. Boston, MA: Springer US doi:10.1007/978-1-4613-0309-1_9.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86, 11–22.
- Fleet, G. H., and Heard, G. M. (1993). *Yeast-growth during fermentation. Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V. D. D. (2013). Extending healthy lifespan - from yeast to humans. *Science (80-.)*. 328, 321–326. doi:10.1126/science.1172539.Dietary.
- Foyt, H. L., Leroith, D., and Roberts, C. T. (1991). Differential Association of Insulin-Like Growth Factor-I Messenger-Rna Variants with Polysomes In vivo. *J. Biol. Chem.* 266, 7300–7305.
- Francis, B. R., White, K. H., and Thorsness, P. E. (2007). Mutations in the Atp1p and Atp3p subunits of yeast ATP synthase differentially affect respiration and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 127–144. doi:10.1007/s10863-007-9071-4.
- Fuchs, S. M., Larabee, R. N., and Strahl, B. D. (2009). Protein modifications in transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 26–36. doi:10.1016/j.bbagr.2008.07.008.Protein.

- Gamero-sandemetrio, E., Gómez-pastor, R., and Matallana, E. (2013). Zymogram profiling of superoxide dismutase and catalase activities allows *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species differentiation and correlates to their fermentation performance. *Appl. Microb. cell Physiol.* 97, 4563–4576. doi:10.1007/s00253-012-4672-1.
- Gamero-Sandemetrio, E., Gomez-PAstor, R., and Matallana, Em. (2014). Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnol J* 9, 1055–1064. doi:10.1002/biot.201300448.
- Gan, Z. R. (1991). Yeast thioredoxin genes. *J. Biol. Chem.* 266, 1692–1696.
- Garcia-barrio, M., Dong, J., Ufano, S., and Hinnebusch, A. G. (2000). Association of GCN1 ± GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2 a kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J.* 19, 1887–1899.
- 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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., et al. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–57. doi:10.1091/MBC.11.12.4241.
- Ghezzi, P., and Bonetto, V. (2003). Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3, 1145–1153. doi:10.1002/pmic.200300435.
- Gilbert, H. F. (1995). Biothiols Part A Monothiols and Dithiols, Protein Thiols, and Thiyl Radicals. *Methods Enzymol.* 251, 8–28. doi:10.1016/0076-6879(95)51107-5.
- Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, a, Colombo, R., and Dalle-Donne, I. (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 201–212. doi:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00275.x.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Jean-Marie., B., Perrot, K., Sylvie., et al. (1998). The H₂O₂ Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 22480–22489.
- Gómez-pastor, R., Pérez-torrado, R., CabiscoL, E., Ros, J., and Matallana, E. (2012a). Engineered Trx2p industrial yeast strain protects glycolysis and fermentation proteins from oxidative carbonylation during biomass propagation. *Microb. Cell Fact.* 11, 4. doi:10.1186/1475-2859-11-4.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., CabiscoL, E., Ros, J., and Matallana, E. (2010). 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. doi:10.1186/1475-2859-9-9.
- Gómez-pastor, R., Pérez-torrado, R., and Matallana, E. (2012b). Modification of the TRX2 gene dose in *Saccharomyces cerevisiae* affects hexokinase 2 gene regulation during wine yeast biomass production. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 773–787. doi:10.1007/s00253-011-3738-9.
- Gomez, E., Mohammad, S. S., and Pavitt, G. D. (2002). Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: The guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO J.* 21, 5292–5301. doi:10.1093/emboj/cdf515.

Bibliografía

- Gonskikh, Y., and Polacek, N. (2017). Alterations of the translation apparatus during aging and stress response. *Mech. Ageing Dev.*, 0–1. doi:10.1016/j.mad.2017.04.003.
- González, S. S., Barrio, E., and Querol, A. (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2314–2320. doi:10.1128/AEM.01867-07.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., et al. (1997). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12, 586–597.
- Gourlay, C. W., and Ayscough, K. R. (2006). Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6487–501. doi:10.1128/MCB.00117-06.
- Govind, C. K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., and Hinnebusch, A. G. (2007). Gcn5 Promotes Acetylation, Eviction, and Methylation of Nucleosomes in Transcribed Coding Regions. *Mol. Cell* 25, 31–42. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.020.
- Grant, C. M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J. Biol.* 7, 1. doi:10.1186/jbiol63.
- Grant, C. M., Luikenhuis, S., Beckhouse, A., Soderbergh, M., and Dawes, I. W. (2000). Differential regulation of glutaredoxin gene expression in response to stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1490, 33–42. doi:10.1016/S0167-4781(99)00234-1.
- Grant, C. M., Maclver, F. H., and Dawes, I. W. (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell* 8, 1699–1707. doi:10.1091/mbc.8.9.1699.
- Grant, C. M., Perrone, G., and Dawes, I. W. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 893–8. doi:10.1006/bbrc.1998.9864.
- Greetham, D., and Grant, C. M. (2009). Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3229–3240. doi:10.1128/MCB.01918-08.
- Greetham, D., Vickerstaff, J., Shenton, D., Perrone, G. G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2010). Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* 11, 3. doi:10.1186/1471-2091-11-3.
- Griffith, W. (1980). Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine Using. *Anal. Biochem.* 212, 207–212.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., Hegemann, J. H., Gießen, J., et al. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519–2524.
- Gulshan, K., Rovinsky, S. A., Coleman, S. T., and Moye-Rowley, W. S. (2005). Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 280, 40524–40533. doi:10.1074/jbc.M504716200.

- Gurskiy, D. Y., Nabirochkina, E. N., and Kopytova, D. V (2013). Role of multifunctional coactivator complex SAGA in regulation of eukaryotic gene expression. *Mol. Biol.* 47, 796–802. doi:10.1134/s002689331306006x.
- Hadfield, C. J., B. E., M. R. C., G.H.J, P., and E., A. B. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 18, 303–313. doi:10.1038/ncomms10595.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073.
- Hammond, J. R. (2003). Yeast Genetics. *Brew. Microbiol.* 3, 67–112. doi:10.1007/978-1-4939-1363-3.
- Han, Y., Luo, J., Ranish, J., and Hahn, S. (2014). Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA transcription coactivator complex. *EMBO J.* 33, 2534–46. doi:10.15252/embj.201488638.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., et al. (2010). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–395. doi:10.1016/S1073-5437(10)79498-5.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005). Glutathione Transferases. *Rev. Lit. Arts Am.* 45, 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- Hedbacker, K., and Carlson, M. (2006). Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryot. Cell* 5, 1950–1956. doi:10.1128/EC.00256-06.
- Heird, W. C., and Lapillonne, A. (2005). the Role of Essential Fatty Acids in Development. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 549–571. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132254.
- Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M. N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5, 105–18. doi:10.1091/mbc.5.1.105.
- Henick-kling, T. (1988). Yeast and bacterial control in winemaking. *Mod. Methods Plant Anal. New Ser. Vol. 6. Wine Anal.*, 277–316.
- Henry, K. W., Wyce, A., Lo, W. S., Duggan, L. J., Emre, N. C. T., Kao, C. F., et al. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* 17, 2648–2663. doi:10.1101/gad.1144003.
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 602–607. doi:10.1016/S1369-5274(02)00377-6.
- Hernández, H., Aranda, C., Riego, L., and González, A. (2011). Gln3-Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast

Bibliografía

- Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 859–864. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.075.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., and Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1217–1235. doi:10.1016/j.bbagen.2007.12.004.
- Higgins, C. M. J., Jung, C., and Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* 4, 16. doi:10.1186/1471-2202-4-16.
- Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J., and Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal β -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 35–64. doi:10.1016/S0168-6445(03)00017-2.
- Hinnebusch, A. G. (1986). The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21, 277–317.
- Hittinger, C. T. (2013). *Saccharomyces* diversity and evolution: A budding model genus. *Trends Genet.* 29, 309–317. doi:10.1016/j.tig.2013.01.002.
- Ho, P.-W., Swinnen, S., Duitama, J., and Nevoigt, E. (2017). The sole introduction of two single-point mutations establishes glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK derivatives. *Biotechnol. Biofuels* 10, 10. doi:10.1186/s13068-016-0696-6.
- Hoek, P. I. M. V. A. N., Dijken, J. P. V. A. N., and Pronk, J. T. (1998). Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. *Appl Environ. Microbiol.* 64, 4226–4233.
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation. *Gene* 51, 267–272.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963–13966.
- Hong, S. P., and Carlson, M. (2007). Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.* 282, 16838–16845. doi:10.1074/jbc.M700146200.
- Huang, X., Liu, J., and Dickson, R. C. (2012). Down-regulating sphingolipid synthesis increases yeast lifespan. *PLoS Genet.* 8. doi:10.1371/journal.pgen.1002493.
- Huber, A., French, S. L., Tekotte, H., Yerlikaya, S., Stahl, M., Perepelkina, M. P., et al. (2011). Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *EMBO J.* 30, 3052–64. doi:10.1038/emboj.2011.221.
- Ikner, A., and Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* 569, 13–27. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.09.006.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163–168. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6336730>.
- Izawa, S., Kuroki, N., and Inoue, Y. (2004). Nuclear thioredoxin peroxidase Dot5 in *Saccharomyces cerevisiae*: Roles in oxidative stress response and disruption of telomeric silencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 120–124. doi:10.1007/s00253-003-1421-5.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V (2010). The mechanism of eukaryotic

- translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127. doi:10.1038/nrm2838.
- Jacob, C., Knight, I., and Winyard, P. G. (2006). Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: From simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol. Chem.* 387, 1385–1397. doi:10.1515/BC.2006.174.
- Jakubowski, W., Bilinski, T., and , Bartosz, G. (2000). OXIDATIVE STRESS DURING AGING OF STATIONARY CULTURES OF. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 659–664.
- Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., et al. (2004). Two enzymes in one: Two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117, 625–635. doi:10.1016/j.cell.2004.05.002.
- Jazwinski, S. M. (2005). The retrograde response links metabolism with stress responses, chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging. *Gene* 354, 22–27. doi:10.1016/j.gene.2005.03.040.
- Jia, M. H., Lee, J. M., LaRossa, R. A., Rafalski, A., Derose, E., Gonye, G., et al. (2000). Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiol. Genomics* 3, 83–92. doi:3/2/83 [pii].
- Johnson, D. (2010). New connections identify Sch9 as a central node in ribosome biosynthesis. *Cell Cycle* 9, 22–27. doi:10.4161/cc.9.1.10566.
- Ju, D., Xu, H., Wang, X., and Xie, Y. (2007). Ubiquitin-mediated degradation of Rpn4 is controlled by a phosphorylation-dependent ubiquitylation signal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773, 1672–1680. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.04.012.
- Kaeberlein, M. (2010). Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* 464, 513–519. doi:10.1038/nature08981.Lessons.
- Kapahi, P., Kaberlein, M., and Hansen, M. (2016). Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res. Rev.* doi:10.1016/j.arr.2016.12.005.
- Kataoka, T., Broek, D., and Wigler, M. (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* 43, 493–505. doi:0092-8674(85)90179-5 [pii].
- Kharade, S. V., Mittal, N., Das, S. P., Sinha, P., and Roy, N. (2005). Mrg19 depletion increases *S. cerevisiae* lifespan by augmenting ROS defence. *FEBS Lett.* 579, 6809–6813. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.017.
- Kira, S., Kumano, Y., Ukai, H., Takeda, E., Matsuura, A., and Noda, T. (2016). Dynamic relocation of the TORC1-Gtr1/2-Ego1/2/3 complex is regulated by Gtr1 and Gtr2. *Mol. Biol. Cell* 27, 382–396. doi:10.1091/mbc.E15-07-0470.
- Klinger, H., Rinnerthaler, M., Lam, Y. T., Laun, P., Heeren, G., Klocker, A., et al. (2010). Quantitation of (a)symmetric inheritance of functional and of oxidatively damaged mitochondrial aconitase in the cell division of old yeast mother cells. *Exp. Gerontol.* 45, 533–542. doi:10.1016/j.exger.2010.03.016.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539–545.

Bibliografía

doi:10.1016/S1534-5807(03)00296-X.

- Knutsen, J. H. J., Rødland, G. E., Bøe, C. A., Håland, T. W., Sunnerhagen, P., Grallert, B., et al. (2015). Stress-induced inhibition of translation independently of eIF2 α phosphorylation. *J. Cell Sci.* 44, 4420–4427. doi:10.1242/jcs.176545.
- Koc, A., and Merrill, G. F. (2007). Checkpoint deficient rad53-11 yeast cannot accumulate dNTPs in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 527–530. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.049.
- Kos-Braun, I. C., Jung, I., and Koš, M. (2017). Tor1 and CK2 kinases control a switch between alternative ribosome biogenesis pathways in a growth-dependent manner. *PLoS Biol.* 15, e2000245. doi:10.1371/journal.pbio.2000245.
- Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B., and Correa, W. S. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 593–596. doi:10.1016/0006-291X(69)90850-X.
- Krohn, M., Skjølberg, H. C., Soltani, H., Grallert, B., and Boye, E. (2008). The G1-S checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint. *J. Cell Sci.* 121, 4047–54. doi:10.1242/jcs.035428.
- Kruegel, U., Robison, B., Dange, T., Kahlert, G., Delaney, J. R., Kotireddy, S., et al. (2011). Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 7. doi:10.1371/journal.pgen.1002253.
- Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z., and Gladyshev, V. N. (2002). Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4245–4250. doi:10.1073/pnas.072603099.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., et al. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6139–50. doi:10.1128/MCB.21.18.6139.
- Kunzt, J. B., Schwarz, H., and Mayer, A. (2004). Determination of Four Sequential Stages during Microautophagy in Vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 9987–9996. doi:10.1074/jbc.M307905200.
- Lafon-Lafourcade, S. (1982). *Wine and brandy*. n Reed, G. (ed). Biotechnology. Verlag-Chemie. Heidelberg.
- Lageix, S., Rothenburg, S., Dever, T. E., and Hinnebusch, A. G. (2014). Enhanced Interaction between Pseudokinase and Kinase Domains in Gcn2 stimulates eIF2 α Phosphorylation in Starved Cells. *PLoS Genet.* 10, 1–20. doi:10.1371/journal.pgen.1004326.
- 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.
- Larabee, R. N., Fuchs, S. M., and Strahl, B. D. (2007). H2B ubiquitylation in transcriptional control: A FACT-finding mission. *Genes Dev.* 21, 737–743. doi:10.1101/gad.1541507.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., et al. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol* 39, 1166–1173.

- Lavoie, H., and Whiteway, M. (2008). Increased respiration in the sch9 mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryot. Cell* 7, 1127–1135. doi:10.1128/EC.00330-07.
- Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F., and Toledano, M. B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: Contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 10420–10430. doi:10.1074/jbc.M513346200.
- Lee, K. K., Sardi, M. E., Swanson, S. K., Gilmore, J. M., Torok, M., Grant, P. A., et al. (2011). Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol. Syst. Biol.* 7, 503. doi:10.1038/msb.2011.40.
- Lee, S., Carlson, T., Christian, N., Lea, K., Kedzie, J., Reilly, J. P., et al. (2000). The yeast heat shock transcription factor changes conformation in response to superoxide and temperature. *Mol. Biol. Cell* 11, 1753–64.
- Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S. C., Van Dyk, T. K., Ficke, M. B., and Golin, J. (1990). Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* 125, 13–20.
- Levine, B., Sinha, S., and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4, 600–606. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., et al. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14539–44. doi:10.1073/pnas.1105430108.
- Lin, S. S., Manchester, J. K., and Gordon, J. I. (2003). Sip2, an N-myristoylated ?? subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *J. Biol. Chem.* 278, 13390–13397. doi:10.1074/jbc.M212818200.
- Liochev, S. I., and Fridovich, I. (1999). ON THE ROLE OF BICARBONATE IN PEROXIDATIONS CATALYZED BY Cu,Zn SUPEROXIDE DISMUTASE. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1444–1447. doi:10.1016/j.jemermed.2015.03.012.
- Liu, X. D., and Thiele, D. J. (1996). Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* 10, 592–603.
- Liu, Z., and Butow, R. A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.* 40, 159–185. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090613.
- Longo, V. D. (1999). Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol Aging* 20, 479–486.
- Longo, V. D., and Finch, C. E. (2003). Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science (80-)*. 299, 1342–1346. doi:10.1126/science.1077991.
- Longo, V. D., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1996). Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 271, 12275–12280.

Bibliografia

- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., et al. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953–961. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U.
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9, 1081–91. doi:10.1091/mbc.9.5.1081.
- Luk, E. E., and Culotta, V. C. (2001). Manganese Superoxide Dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* Acquires Its Metal Co-factor through a Pathway Involving the Nramp Metal Transporter, Smf2p*. *J. Biol. Chem.* 276, 47556–47562. doi:10.1074/jbc.M108923200.
- Lushchak, V. I., and Gospodaryov, D. V (2005). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* 29, 187–192. doi:10.1016/j.cellbi.2004.11.001.
- Macierzynska, E., Grzelak, A., and Bartosz, G. (2007). THE EFFECT OF GROWTH MEDIUM ON THE ANTIOXIDANT DEFENSE OF *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 12, 448–456. doi:10.2478/s11658-007-0017-y.
- Maclean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., et al. (2010). Skyline : an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966–968. doi:10.1093/bioinformatics/btq054.
- Mak, H. C., Pillus, L., and Ideker, T. (2009). Dynamic reprogramming of transcription factors to and from the subtelomere. *Genome Res.* 19, 1014–1025. doi:10.1101/gr.084178.108.
- Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with GST. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3780–3785. doi:10.1073/pnas.0400181101.
- Mannarino, S. C. et al (2011). Requirement of glutathione for Sod1 activation during lifespan extension. *Yeast* 28, 19–25. doi:10.1002/yea.
- Mansilla, M. C., and De Mendoza, D. (2005). The *Bacillus subtilis* desaturase: A model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch. Microbiol.* 183, 229–235. doi:10.1007/s00203-005-0759-8.
- Marcus, L., Ris, H., Halvorson, H. O., Bretthauer, R. K., and Bock, R. M. (1967). Occurrence, isolation, and characterization of polyribosomes in yeast. *J. Cell Biol.* 34, 505–512.
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227–2235.
- Martins, A. M., Mendes, P., Cordeiro, C., and Freire, A. P. (2001a). In situ kinetic analysis of glyoxalase I and glyoxalase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 268, 3930–3936.
- Martins, A. M. T. B. S., Cordeiro, C. A. A., Maria, A., and Freire, J. P. (2001b). In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 499, 41–44.
- Martins, D., and English, A. M. (2014). Redox Biology SOD1 oxidation and formation of soluble

- aggregates in yeast : Relevance to sporadic ALS development. *Elsevier* 2, 632–639. doi:10.1016/j.redox.2014.03.005.
- Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L. C., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, Ma. P., and Grant, C. M. (2008). Gcn4 Is Required for the Response to Peroxide Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 19, 2995–3007. doi:10.1091/mbc.E07.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., and Dubourdieu, D. (2010). Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 79–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.038.
- Matecic, M., Smith, D. L., Pan, X., Maqani, N., Bekiranov, S., Boeke, J. D., et al. (2010). A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet* 6, e1000921. doi:10.1371/journal.pgen.1000921.
- McCormick, M. A., Mason, A. G., Guyenet, S. J., Dang, W., Garza, R. M., Ting, M. K., et al. (2014). The SAGA Histone Deubiquitinase Module Controls Yeast Replicative Lifespan via Sir2 Interaction. *Cell Rep.* 8, 477–486. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.037.
- McDonagh, B., Padilla, C. A., Pedrajas, J. R., and Barcena, J. A. (2011a). Biosynthetic and iron metabolism is regulated by thiol proteome changes dependent on glutaredoxin-2 and mitochondrial peroxiredoxin-1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 286, 15565–15576. doi:10.1074/jbc.M110.193102.
- McDonagh, B., Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., and Bárcena, J. A. (2013). Thiol redox sensitivity of two key enzymes of heme biosynthesis and pentose phosphate pathways: Uroporphyrinogen decarboxylase and transketolase. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. doi:10.1155/2013/932472.
- McDonagh, B., Requejo, R., Fuentes-Almagro, C. A., Ogueta, S., Bárcena, J. A., and Padilla, C. A. (2011b). Thiol redox proteomics identifies differential targets of cytosolic and mitochondrial glutaredoxin-2 isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. Reversible S-glutathionylation of DHBP synthase (RIB3). *J. Proteomics* 74, 2487–2497. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.018.
- McDonagh, B., Sakellariou, G. K., Smith, N. T., Brownridge, P., and Jackson, M. J. (2014). Differential cysteine labeling and global label-free proteomics reveals an altered metabolic state in skeletal muscle aging. *J. Proteome Res.* 13, 5008–5021. doi:10.1021/pr5006394.
- McDonagh, B., Tyther, R., and Sheehan, D. (2005). Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 73, 315–326. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.020.
- McDonoughss, V. M., Stukeysv, J. E., and Martin, E. (1992). Specificity of Unsaturated Fatty Acid-regulated Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 Gene *. *J. Biol. Chem.* 267, 5931–5936.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *PNAS* 101, 17593–8. doi:10.1073/pnas.0407921102.
- Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). glutathione. *ann. Rev. Bioschem* 52, 711–60.

Bibliografía

- Meneses, F. J., Henschke, P. A., and Jiranek, V. (2002). A Survey of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Numerous Altered Patterns of Maltose and Sucrose Utilisation. *J. Inst. Brew.* 108, 310–321. doi:10.1002/j.2050-0416.2002.tb00556.x.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., and Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* 43, 335–367. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134201.
- Meyuhas, O. (2008). Chapter 1 Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 268, 1–37. doi:10.1016/S1937-6448(08)00801-0.
- Mieyal, J. J., and Chock, P. B. (2012). Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: Focus on s-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 471–5. doi:10.1089/ars.2011.4454.
- Miwa, S., Riyahi, K., Partridge, L., and Brand, M. D. (2004). Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 388–391. doi:10.1196/annals.1297.069.
- Molin, M., and Demir, A. B. (2014). Linking peroxiredoxin and vacuolar-ATPase functions in calorie restriction-mediated life span extension. *Int. J. Cell Biol.* 2014. doi:10.1155/2014/913071.
- Molin, M., Yang, J., Hanzen, S., Toledano, M. B., Labarre, J., and Nystrom, T. (2011). Life span extension and H₂O₂ resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 43, 823–833. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.027.
- Molina, M. M., Bellí, G., De La Torre, M. A., Rodríguez-Manzanque, M. T., and Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 279, 51923–51930. doi:10.1074/jbc.M410219200.
- Morano, K. A., Grant, C. M., and Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 1157–1195. doi:10.1534/genetics.111.128033.
- Morimoto, R. I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 22, 1427–1438. doi:10.1101/gad.1657108.
- Mortimer, R. K., and Johnston, J. R. (1959). Life Span of Individual Yeast Cells. *Nature* 183, 1751–1752. doi:10.1038/1831751a0.
- Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G., and Polsinelli, M. (1994). Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543–1552. doi:10.1002/yea.320101203.
- Moskovitz, J., and Oien, D. B. (2010). Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 405–15. doi:10.1089/ars.2009.2809.
- Mouaheb, N., Thomas, D., Verdouco, L., Monfort, P., and Meyer, Y. (1998). In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3312–3317.

- Muller, E. G. D. (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266, 9194–9202.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. doi:10.1042/BJ20081386.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Belinda, M., Slade, D., Roberts, C., Alan, G., et al. (2001). Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4347–4368. doi:10.1128/MCB.21.13.4347.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., Masneuf, I., Aigle, M., Kondratieva, V. I., and Dubourdieu, D. (2000). Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 442–449. doi:10.1016/S0723-2020(00)80076-4.
- Nestelbacher, R., Laun, P., Vondráková, D., Pichová, A., Schüller, C., and Breitenbach, M. (2000). The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging. *Exp. Gerontol.* 35, 63–70. doi:10.1016/S0531-5565(99)00087-X.
- Noda, N. N., and Inagaki, F. (2015). Mechanisms of Autophagy. *Annu. Rev. Biophys.* 44, 101–122. doi:10.1146/annurev-biophys-060414-034248.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., et al. (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, 16333–16338. doi:10.1073/pnas.0904673106.
- Nyström, T., Yang, J., and Molin, M. (2012). Peroxiredoxins, gerontogenes linking aging to genome instability and cancer. *Genes Dev.* 26, 2001–2008. doi:10.1101/gad.200006.112.
- Odat, O., Matta, S., Khalil, H., Kampranis, S. C., Pfau, R., Tschlis, P. N., et al. (2007). Old Yellow Enzymes, Highly Homologous FMN Oxidoreductases with Modulating Roles in Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast * □. *J. Biol. Chem.* 282, 36010–36023. doi:10.1074/jbc.M704058200.
- Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2004). Ald6p Is a Preferred Target for Autophagy in Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 16071–16076. doi:10.1074/jbc.M312706200.
- Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.* 280, 31582–31586. doi:10.1074/jbc.M506736200.
- Orozco, H., Matallana, E., and Aranda, A. (2012a). Key Players in the Chronological Life Span of *Saccharomyces cerevisiae* during Winemaking. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2748–2757. doi:10.1128/AEM.07261-11.
- Orozco, H., Matallana, E., and Aranda, A. (2012b). Two carbon-metabolites polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions. *Microb. Cell Fact.* 11, 1–10.
- Orozco, H., Matallana, E., and Aranda, A. (2012c). Wine yeast sirtuins and Gcn5p control aging and metabolism in a natural growth medium. *Mech Ageing Dev* 133, 348–358.

Bibliografía

- doi:10.1016/j.mad.2012.03.013.
- Orozco, H., Matallana, E., and Aranda, A. (2013). Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking. *Microb Cell Fact* 12, 1.
- Ough, C. . (1992). *winemaking basics*. The Haworth Press Inc. Binghamton, New York.
- Pan, Y., Schroeder, E. A., Ocampo, A., Barrientos, A., and Shadel, G. S. (2011). Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab.* 13, 668–678. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.018.
- Parrou, J. L., and Franc, J. (1997). A Simplified Procedure for a Rapid and Reliable Assay of both Glycogen and Trehalose in Whole Yeast Cells. *Anal. Biochem.* 188, 186–188.
- Pascual-García, P., and Rodríguez-Navarro, S. (2009). A tale of coupling, Sus1 function in transcription and mRNA export. *RNA Biol.* 6, 141–144. doi:10.4161/rna.6.2.7793.
- Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.-A., Wright, A. P. †H, and Spyrou, G. (1999). Identification and Functional Characterization of a Novel Mitochondrial Thioredoxin System in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 6366–6373. doi:10.1074/jbc.274.10.6366.
- Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. Å., and Spyrou, G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16296–16301. doi:10.1074/jbc.275.21.16296.
- Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B., and Bárcena, J. A. (2010). Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 249–258. doi:10.1089/ars.2009.2950.
- Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295–305. doi:10.1016/S1567-1356(02)00081-8.
- Perez-Perez, M. E., Zaffagnini, M., Marchand, C. H., Crespo, J. L., and Lemaire, S. D. (2014). The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* 10, 1953–1964. doi:10.4161/auto.34396.
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, 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, 6831–6837. doi:10.1128/AEM.71.11.6831-6837.2005.
- Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C., and Matallana, E. (2009). Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 951–960. doi:10.1007/s00253-008-1722-9.
- Peris, D., Langdon, Q. K., Moriarty, R. V., Sylvester, K., Bontrager, M., Charron, G., et al. (2016). Complex Ancestries of Lager-Brewing Hybrids Were Shaped by Standing Variation in the Wild Yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLoS Genet.* 12, 1–20. doi:10.1371/journal.pgen.1006155.
- Peris, D., Lopes, C. a, Belloch, C., Querol, A., and Barrio, E. (2012). Comparative genomics

- among *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. *BMC Genomics* 13, 407. doi:10.1186/1471-2164-13-407.
- Perrone, G. G., Grant, C. M., and Dawes, I. W. (2005). Genetic and Environmental Factors Influencing Glutathione Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 16, 218–230. doi:10.1091/mbc.E04.
- Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M. S., and Molla, G. (2007). Physiological functions of D-amino acid oxidases: From yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1373–1394. doi:10.1007/s00018-007-6558-4.
- Porrás, P., Padilla, C. A., Krayl, M., Voos, W., and Ba, J. A. (2006). One Single In-frame AUG Codon Is Responsible for a Diversity of Subcellular Localizations of Glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 16551–16562. doi:10.1074/jbc.M600790200.
- Posas, F., Chamber, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., De Nadal, E., and Ariño, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 275, 17249–17255. doi:10.1074/jbc.M910016199.
- Powers, R. W., 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, 174–184. doi:10.1101/gad.1381406.
- Pray-Grant, M. G., Schieltz, D., McMahon, S. J., Wood, J. M., Kennedy, E. L., Cook, R. G., et al. (2002). The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8774–86. doi:10.1128/MCB.22.24.8774.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729. doi:10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E., and Perez-Ortin, J. E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2057–2061.
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., and de la Torre-Ruiz, M. A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 119, 4554–64. doi:10.1242/jcs.03229.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., Del Olmo, M., and Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 3–10. doi:10.1016/S0168-1605(03)00244-7.
- 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, 841–850.
- Ragu, S., Dardalhon, M., Sharma, S., Iraqui, I., Buhagiar-Labarchède, G., Grondin, V., et al. (2014). Loss of the Thioredoxin Reductase Trr1 Suppresses the Genomic Instability of Peroxiredoxin tsa1 Mutants. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0108123.
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., and Ashikari, T. (2006). Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3968–

Bibliografía

3974. doi:10.1128/AEM.02769-05.
- Raitt, D. C., Johnson, a L., Erkin, a M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., et al. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 11, 2335–2347. doi:10.1091/MBC.11.7.2335.
- Rajesh, K., Krishnamoorthy, J., Kazimierczak, U., Tenkerian, C., Papadakis, a I., Wang, S., et al. (2015). Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. *Cell Death Dis.* 6, e1591. doi:10.1038/cddis.2014.554.
- Rand, J. D., and Grant, C. M. (2006a). The Thioredoxin System Protects Ribosomes against Stress-induced Aggregation. *Mol. Biol. Cell* 17, 387–401. doi:10.1091/mbc.E05.
- Rand, J. D., and Grant, C. M. (2006b). The Thioredoxin System Protects Ribosomes against Stress-induced Aggregation. *Mol. Biol.* 17, 387–401. doi:10.1091/mbc.E05.
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J. M., Yates, J., Aronova, S., Chu, S., et al. (2004). TOR Complex 1 Includes a Novel Component, Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 14752–14762. doi:10.1074/jbc.M313062200.
- Reinke, A., Chen, J. C. Y., Aronova, S., and Powers, T. (2006). Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J. Biol. Chem.* 281, 31616–31626. doi:10.1074/jbc.M603107200.
- Reynolds, J. A. (1979). [5] The role of micelles in protein-detergent interactions. *Methods Enzymol.* 61, 58–62. doi:10.1016/0076-6879(79)61007-8.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2005). *Handbook of Enology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd doi:10.1002/0470010363.
- Riou, C., Nicaud, J. M., Barre, P., and Gaillardin, C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* 13, 903–915. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199708)13:10<903::AID-YEA145>3.0.CO;2-1.
- Rispa, D., Eltschinger, S., Stahl, M., Vaga, S., Bodenmiller, B., Abraham, Y., et al. (2015). Target of rapamycin complex 2 regulates actin polarization and endocytosis via multiple pathways. *J. Biol. Chem.* 290, 14963–14978. doi:10.1074/jbc.M114.627794.
- Ristow, M., and Schmeisser, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 327–336. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010.
- Roberts, B. R., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Malencik, D. A., Anderson, S. R., Bomben, V. C., et al. (2007). Structural Characterization of Zinc-deficient Human Superoxide Dismutase and Implications for ALS. *J Mol Biol* 373, 877–890. doi:10.1097/OPX.0b013e3182540562.The.
- Robyt, F., and Whelan, J. (1972). Value Methods for Maltodextrins : The alkaline 3 , 5-dinitrosalicylate reagent (DNSA) was introduced in 1921 by Samner for the determination of reducing substances in blood and urine (2 , 3). The reagent was later adapted for the measurement of reduci. *Anal. Biochem.* 516, 510–516.
- Rockefeller, P., and Madeo, F. (2008). Apoptotic death of ageing yeast. *Exp. Gerontol.* 43, 876–881. doi:10.1016/j.exger.2008.08.044.

- Rodicio, R., Strauß, A., and Heinisch, J. J. (2000). Single point mutations in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolish allosteric inhibition by ATP. *J. Biol. Chem.* 275, 40952–40960. doi:10.1074/jbc.M007131200.
- Rodríguez-Colman, M. J., Sorolla, M. A., Vall-Illaura, N., Tamarit, J., Ros, J., and Cabiscol, E. (2013). The FOX transcription factor Hcm1 regulates oxidative metabolism in response to early nutrient limitation in yeast. Role of Snf1 and Tor1/Sch9 kinases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 2004–2015. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.015.
- Rodríguez-Manzaneque, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13, 1109–1121. doi:10.1091/mbc.01.
- Rodríguez-Navarro, S. (2009). Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep.* 10, 843–850. doi:10.1038/embor.2009.168.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., and Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 181–188. doi:10.1016/S0168-1605(03)00255-1.
- Rolland, F., De Winde, J. H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J. M., and Winderickx, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* 38, 348–358. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02125.x.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180. doi:10.1016/S0168-1605(03)00290-3.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., and Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* 20, 1369–1385. doi:10.1002/yea.1046.
- Ruan, H., Tang, X. D., Chen, M.-L., Joiner, M.-L. A., Sun, G., Brot, N., et al. (2002). High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2748–53. doi:10.1073/pnas.032671199.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A., and Guillamón, J. M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 1155–1161. doi:10.1016/j.fm.2011.03.008.
- Samara, N. L., and Wolberger, C. (2011). A new chapter in the transcription SAGA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 767–774. doi:10.1016/j.sbi.2011.09.004.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd edn.* Cold Spring Harbor Laboratory. 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, 1466–1470. doi:10.1042/BST0391466.
- Sandemtrio, E. G., Torrellas, M., Rábena, M. T., Pastor, R. G., Aranda, A., and Matallana, E. (2015). Food - grade argan oil supplementation in molasses enhances fermentative performance and antioxidant defenses of active dry wine yeast. *AMB Express.* doi:10.1186/s13568-015-0159-7.

Bibliografia

- Schafer, F. Q., and Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212. doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- Shahbazian, M. D., and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 75–100. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114.
- Shirra, M. K., McCartney, R. R., Zhang, C., Shokat, K. M., Schmidt, M. C., and Arndt, K. M. (2008). A chemical genomics study identifies Snf1 as a repressor of GCN4 translation. *J. Biol. Chem.* 283, 35889–35898. doi:10.1074/jbc.M805325200.
- Sicard, D., and Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus - Biol.* 334, 229–236. doi:10.1016/j.crvi.2010.12.016.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 25, 1058–1071. doi:10.1002/anie.198610581.
- Simpson, C. E., and Ashe, M. P. (2012). Adaptation to stress in yeast: to translate or not? *Biochem. Soc. Trans.* 40, 794–9. doi:10.1042/BST20120078.
- Skoneczna, A., Miciałkiewicz, A., and Skoneczny, M. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1409–1420. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.042.
- Skvirsky, R. C., Greenberg, M. L., Myers, P. L., and Greer, H. (1986). A new negative control gene for amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 10, 495–501.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., et al. (2010). *Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in Saccharomyces cerevisiae*. doi:10.1007/s00294-009-0287-1.
- Smith, J. J., Miller, L. R., Kreisberg, R., Vazquez, L., Wan, Y., and Aitchison, J. D. (2011). Environment-responsive transcription factors bind subtelomeric elements and regulate gene silencing. *Mol. Syst. Biol.* 7, 455. doi:10.1038/msb.2010.110.
- Starke, D. W., Chock, P. B., and Mieyal, J. J. (2003). Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase): Potential role in redox signal transduction. *J. Biol. Chem.* 278, 14607–14613. doi:10.1074/jbc.M210434200.
- Staschke, K. A., Dey, S., Zaborske, J. M., Palam, L. R., McClintick, J. N., Pan, T., et al. (2010). Integration of general amino acid control and Target of Rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast. *J. Biol. Chem.* 285, 16893–16911. doi:10.1074/jbc.M110.121947.
- 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. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123509.
- Stuckey, S., Mukherjee, K., and Storici, F. (2011). In Vivo Site-Specific Mutagenesis and Gene Collage Using the Delitto Perfetto System in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 745, 33–45. doi:10.1007/978-1-61779-129-1.
- Suganuma, T., and Workman, J. L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* 135,

- 604–607. doi:10.1016/j.cell.2008.10.036.
- Sugiyama, K., Kawamura, A., Izawa, S., and Inoue, Y. (2000). Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 352, 71–78. doi:10.1042/0264-6021:3520071.
- Tan, S. X., Greetham, D., Raeth, S., Grant, C. M., Dawes, I. W., and Perrone, G. G. (2010). The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 6118–6126. doi:10.1074/jbc.M109.062844.
- Tao, L., and English, A. M. (2004). Protein S-Glutathiolation Triggered by Decomposed S-Nitrosoglutathione. *Biochemistry* 43, 4028–4038. doi:10.1021/bi035924o.
- Tate, J. J., Georis, I., Feller, A., Dubois, E., and Cooper, T. G. (2009). Rapamycin-induced Gln3 dephosphorylation is insufficient for nuclear localization: Sit4 and PP2A phosphatases are regulated and function differently. *J. Biol. Chem.* 284, 2522–2534. doi:10.1074/jbc.M806162200.
- Temple, M. D., Perrone, G. G., and Dawes, I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 15, 319–326. doi:10.1016/j.tcb.2005.04.003.
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., and Blondin, B. (2013). Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0061645.
- Testa, C. M., Sherer, T. B., and Greenamyre, J. T. (2005). Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Mol. Brain Res.* 134, 109–118. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.11.007.
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., et al. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 819–825. doi:10.1016/S0141-0229(00)00177-0.
- Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J., and Dawes, I. W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6564–6569. doi:10.1073/pnas.0305888101.
- Tietze, F. (1969). Enzymic Method for Quantitative Nanogram Amounts of Total Glutathione : Determination and Oxidized. *Anal. Biochem.* 52, 502–522.
- Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., and Tacnet, F. (2007). The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett.* 581, 3598–3607. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.002.
- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., and Jones, N. (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: Requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev.* 12, 1453–1463. doi:10.1101/gad.12.10.1453.
- Torelli, N. Q., Ferreira-Júnior, J. R., Kowaltowski, A. J., and Da Cunha, F. M. (2015). RTG1- and RTG2-dependent retrograde signaling controls mitochondrial activity and stress

Bibliografía

- resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 81, 30–37. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.025.
- Trauch, J. A., Mumby, M., and Traut, R. R. (1973). Phosphorylation of ribosomal proteins by substrate-specific protein kinases from rabbit reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 373–6.
- Trotter, E. W., and Grant, C. M. (2002). Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol.* 46, 869–878.
- 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. doi:10.1128/EC.4.2.392.
- Trotter, E. W., Rand, J. D., Vickerstaff, J., and Grant, C. M. (2008). The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochem J* 412, 73–80. doi:10.1042/BJ20071634.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., et al. (2007). Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 26, 663–674. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.020.
- Usaitte, R., Jewett, M. C., Oliveira, A. P., Yates, J. R., Olsson, L., Nielsen, J., et al. (2009). Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. *Mol. Syst. Biol.* 5, 1056–1060. doi:10.1038/MSB.2009.67.
- Vallejo, B., Orozco, H., Picazo, C., Matallana, E., and Aranda, A. (2016). Sch 9p kinase and the Gcn4p transcription factor regulate glycerol production during winemaking. *FEMS Yeast Res.* fow106. doi:10.1093/femsyr/fow106.
- Veatch, J. R., McMurray, M. A., Nelson, Z. W., and Gottschling, D. E. (2009). Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability: A link through iron-sulfur clusters. *Cell* 137, 1247–1258. doi:10.1016/j.cell.2009.04.014.Mitochondrial.
- Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y., and Morano, K. A. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 115–58. doi:10.1128/MMBR.05018-11.
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R., et al. (2008). Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Mol. Microbiol.* 69, 277–285. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06292.x.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., et al. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet.* 4, 0139–0149. doi:10.1371/journal.pgen.0040013.
- Weids, A. J., and Grant, C. M. (2014). The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress. *J. Cell Sci.* 127, 1327–1335. doi:10.1242/jcs.144022.
- Wek, R. C., Jiang, H.-Y., Anthony, T. G., Hinnebusch, A. G., Wek, R. C., Staschke, K. A., et al. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7–11. doi:10.1042/BST20060007.
- Welter, E., Thumm, M., and Krick, R. (2015). Quantification of nonselective bulk autophagy in *S. cerevisiae* using Pgl1-GFP. *Autophagy* 6, 794–797. doi:10.4161/auto.6.6.12348.

- Wengrod, O., Wang, D., Weiss, S., and Zhong, Hua Osman, Iman And Lawrence Gardner, B. (2015). Phosphorylation of eIF2 α by mTORC1 inhibition and PP6C activation is required for autophagy and is aberrant in PP6C- mutated melanoma. *sci signal* 8, 1–25. doi:10.1126/scisignal.aaa0899.Phosphorylation.
- Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E., and Peck, V. M. (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 19, 1159–1166. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02461.x.
- Wheeler, G. L., Trotter, E. W., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2003). Coupling of the Transcriptional Regulation of Glutathione Biosynthesis to the Availability of Glutathione and Methionine via the Met4 and Yap1 Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* 278, 49920–49928. doi:10.1074/jbc.M310156200.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., and Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40. doi:10.1016/S0968-0004(02)00003-8.
- Wu, P. J., Ruhlmann, C., Winston, F., and Schultz, P. (1997). Molecular Architecture of the *S. cerevisiae* SAGA. *Nature* 15, 1997–1997. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.005.
- Xiong, Y., Uys, J. D., Tew, K. D., and Townsend, D. M. (2011). S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 233–70. doi:10.1089/ars.2010.3540.
- Yamaguchi, Y., Narita, T., Inukai, N., Wada, T., and Handa, H. (2001). SPT genes: key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes. *J. Biochem.* 129, 185–191.
- Yan, C., Lee, L. H., and Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* 17, 7416–7429. doi:10.1093/emboj/17.24.7416.
- Yeasmin, A. M. S. T., Waliullah, T. M., Kondo, A., Kaneko, A., Koike, N., and Ushimaru, T. (2016). Orchestrated action of PP2A antagonizes atg13 phosphorylation and promotes autophagy after the inactivation of TORC1. *PLoS One* 11, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0166636.
- Yerlikaya, S., Meusburger, M., Kumari, R., Huber, A., Anrather, D., Costanzo, M., et al. (2015). TORC1 and TORC2 work together to regulate Ribosomal Protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 27, 397–409. doi:10.1091/mbc.E15-08-0594.
- Yuan, W., Guo, S., Gao, J., Zhong, M., Yan, G., and Wu, W. (2017a). General Control Nonderepressible 2 (GCN2) Kinase Inhibits Target of Rapamycin Complex 1 in Response to Amino Acid Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2. doi:10.1074/jbc.M116.772194.
- Yuan, W., Guo, S., Gao, J., Zhong, M., Yan, G., Wu, W., et al. (2017b). General Control Nonderepressible 2 (GCN2) Kinase Inhibits Target of Rapamycin Complex 1 in Response to Amino Acid Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2, jbc.M116.772194. doi:10.1074/jbc.M116.772194.
- Zaman, S., Lippman, S. I., Schnepfer, L., Slonim, N., and Broach, J. R. (2009). Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol. Syst. Biol.* 5, 245. doi:10.1038/msb.2009.20.

Bibliografía

Zhou, H., Luo, Y., and Huang, S. (2010). Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 10, 571–81. doi:10.2174/187152010793498663.

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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001.