



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Función de la proteína mitocondrial Slm35
durante el envejecimiento y la respuesta a estrés
en *Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
RAYMOND ALEXIS LABOY MORALES



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Laboy
Morales
Raymond Alexis
+52 55 56225679
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
413490371

2. Datos del tutor

Dra.
María Soledad
Funes
Argüello

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Rosa Estela
Navarro
González

4. Datos del sinodal 2

Dr.
José Francisco
Torres
Quiroz

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Saúl
Cano
Colín

7. Datos del trabajo escrito

Función de la proteína mitocondrial SIm35 durante el envejecimiento y la respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae*
66 páginas
2016

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. María Soledad Funes Argüello en el Departamento de Genética Molecular, División de Investigación Básica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IA200813 e IN202715, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-CB 105631 y 237344) y a la fundación Miguel Alemán Valdés.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios sobre el trabajo presentado: a la Dra. Rosa Estela Navarro González, al Dr. José Francisco Torres Quiroz, a la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y al Biól. Saúl Cano Colín.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por su ayuda técnica: Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega.

A los miembros de la Unidad de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM): a la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros de la Unidad de Imagenología y de la Biblioteca “Armando Gómez Puyou del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

Al Dr. Alexander de Luna Fors y la Dra. Erika Garay del Laboratorio de Sistemas Genéticos de la Unidad de Genómica Avanzada (Langebio), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, por su colaboración durante este trabajo.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda por el apoyo técnico y discusión durante la realización de este trabajo.

A los miembros del laboratorio 204 Sur del IFC por todo el apoyo recibido durante el proyecto: a José Luis Aguilar López, José Carlos Ponce Rojas, María Clara Avendaño Monsalve y Miguel Gandi Valdés Dávila. A los ex-alumnos Armando Roberto Yáñez Falcón de la Barrera y Aldo Meizoso Huesca.

A la ayuda técnica de: Dra. Yolanda Camacho Villasana, Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo, M. en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez, Dra. Martha Calahorra Fuertes, Dra. Paola Moreno Álvarez y Dr. Genaro Vázquez Victorio.

Abreviaturas

AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
cAMP	AMP cíclico
CLS	Esperanza de vida cronológica
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ETC	Cadena de transporte de electrones
mtDNA	DNA mitocondrial
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
PAS	Sitio de ensamblaje del fagóforo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa A
RC	Restricción calórica
RLS	Esperanza de vida replicativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	RNA ribosomal
tRNA	RNA de transferencia

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico en el estudio del envejecimiento	3
2.2 La vía de señalización de TOR	4
2.3 La vía de señalización de Ras/cAMP/PKA	6
2.4 Morfología mitocondrial	7
2.5 Autofagia	10
3. Antecedentes	14
4. Justificación e Hipótesis	16
5. Objetivos	17
6. Materiales y Métodos	18
6.1 Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados	18
6.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
6.1.2 <i>Escherichia coli</i>	20
6.1.3 Verificación de cepas mutantes	20
6.1.4 Plásmidos	23
6.2 Transformación de levadura	23
6.3 Transformación de <i>E. coli</i>	24
6.4 Extracción de DNA genómico de levadura	24
6.5 Extracción de DNA extracromosomal de <i>E. coli</i>	25
6.6 Ensayo de estrés térmico	25
6.7 Extracción de proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i>	26
6.8 Inmunorréplica tipo Western	26
6.8.1 Electroforesis de proteínas	26
6.8.2 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa	27
6.8.3 Detección por quimioluminiscencia	27
6.9 Curvas de envejecimiento cronológico	27
6.9.1 Preparación de los cultivos	27
6.9.2 Medición de viabilidad de las células envejecidas	28

6.9.3 Análisis de los datos	28
6.10 Análisis de la morfología mitocondrial por microscopía confocal	29
6.11 Ensayo de autofagia por restricción de nitrógeno	29
7. Resultados	31
7.1 Efecto de la delección de <i>SLM35</i> sobre la respuesta a estrés térmico	31
7.2 Búsqueda de interacciones genéticas de <i>SLM35</i>	32
7.3 Relación funcional entre <i>SLM35</i> y genes de las vías de TOR/RAS	35
7.4 Extensión en la esperanza de vida mediada por Tor1 y su relación con <i>Slm35</i>	38
7.5 Regulación del sistema antioxidante	39
7.6 Efecto de <i>Slm35</i> sobre la morfología mitocondrial	41
7.7 Relevancia de <i>Slm35</i> en la inducción de la autofagia	43
8. Discusión	45
9. Conclusiones	49
10. Perspectivas	50
11. Anexos	51
11.1 Medios de cultivo	51
11.2 PCR	52
12. Literatura Citada	53

1. Resumen

El envejecimiento es un proceso caracterizado por la acumulación de daño en los componentes celulares, durante el periodo de vida del organismo, que lleva progresivamente a un deterioro de las distintas funciones biológicas y a un aumento en la probabilidad de muerte. Este es un proceso multifactorial y puede ser afectado por factores extrínsecos como el ambiente y la disponibilidad de nutrientes, y por factores genéticos intrínsecos. Las mitocondrias son organelos que juegan un papel importante en la regulación del envejecimiento integrando distintas vías de señalización.

En el siguiente trabajo reportamos la primera caracterización funcional de la proteína mitocondrial Slm35 (“Stress and Longevity Mitochondrial factor”; Yjr100c) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante un análisis del promotor de *SLM35* se identificaron sitios de regulación conservados en genes que codifican para proteínas que están involucradas en la respuesta a estrés y en la entrada a la fase postdiáuxica de crecimiento. Encontramos que la delección de *SLM35* aumenta la resistencia de la levadura al estrés térmico e identificamos que posee una relación funcional con la vía de TOR. Esta vía de señalización está involucrada en la regulación del crecimiento celular dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y el estrés celular.

Una cepa que carece de *TOR1* y *SLM35* es incapaz de contender contra el estrés térmico, además que presenta una disminución en la esperanza de vida cronológica (CLS) en un 86%. La sensibilidad de la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ no se debe a diferencias en los niveles basales de la enzima antioxidante Sod2. Sin embargo, se observó una disminución en la inducción de la autofagia en esta doble mutante. Finalmente, nuestros datos indican que Slm35 afecta la morfología mitocondrial. La eliminación de *SLM35* evita la fragmentación de la red mitocondrial en fase estacionaria de crecimiento en comparación con la cepa silvestre. En contraste, la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ tiene un aumento en la fragmentación de las mitocondrias. Nuestros datos indican que Slm35 juega un rol importante en la vía de TOR, conectando la biogénesis mitocondrial con la respuesta a estrés y el envejecimiento.

2. Introducción

El envejecimiento es un proceso de acumulación de daños en las moléculas, células y tejidos, que eventualmente resultan en pérdida de función e incremento en la probabilidad de muerte de un organismo. Existen muchas teorías que intentan explicar los mecanismos por los cuales los organismos envejecen, aunque la teoría de envejecimiento por radicales libres es de las más aceptadas. Esta teoría propone que la acumulación de daños en las biomoléculas, causados por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), lleva a un daño celular irreversible y a un deterioro de las funciones fisiológicas del organismo (Harman, 1972).

Las mitocondrias juegan un papel importante en este proceso ya que se consideran la mayor fuente de producción de ROS durante la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés; Liu *et al.*, 2002). Los electrones son transferidos al oxígeno mediante reacciones no enzimáticas para generar el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual se transforma mediante reacciones espontáneas o enzimáticas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último es el encargado de la producción del radical hidroxilo ($\bullet OH$), el radical más reactivo. Se ha relacionado que la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) desregula la función de la ETC, lo que intensifica la producción de ROS. El aumento en la producción de ROS puede incrementar de manera exponencial los niveles de daño al mtDNA y el estrés oxidativo en la célula, por lo que se vuelve un círculo vicioso (Bandy & Davidson, 1990).

Estudios a escala genómica en el nematodo *Caenorhabditis elegans* indican que la reducción en la expresión de muchos genes involucrados en la biogénesis o función de la ETC extiende la esperanza de vida en este animal (Dillin *et al.*, 2002; Durieux *et al.*, 2011). Sin embargo, existe evidencia de que las ROS podrían estar modulando de manera dosis dependiente diferentes vías intracelulares, teniendo efectos positivos sobre la longevidad del organismo (Pan *et al.*, 2011). La hormesis se refiere a los efectos benéficos y a la protección que otorgan intervenciones en bajas concentraciones, las cuales podrían ser perjudiciales en altas concentraciones (Calabrese, 2013). Se ha propuesto que este proceso retrasa el envejecimiento afectando el metabolismo de las ROS (Mendelsohn & Larrick, 2013). Además, se ha visto que el uso de antioxidantes no siempre tiene efectos positivos sobre la supervivencia y hasta pudieran ser perjudiciales para los organismos (Miller *et al.*, 2005); y la eliminación de enzimas antioxidantes no disminuye la esperanza de vida, inclusive podrían

tener efectos prolongevidad (Van Raamsdonk & Hekimi, 2009). Estos datos indican que la función mitocondrial es fundamental para la modulación de la esperanza de vida y la relación de las mitocondrias con el envejecimiento sigue siendo un tema de debate (Schiavi & Ventura, 2014).

En las últimas décadas se ha dado un avance muy importante en el estudio del envejecimiento a nivel genético, y actualmente se conocen una gran cantidad de genes involucrados en vías de señalización que regulan la esperanza de vida en organismos modelo de laboratorio. La inhibición de algunas rutas puede extender la esperanza de vida, la cual está relacionada a su vez con un aumento en la resistencia a distintos tipos de estrés y extensión del periodo en el que el organismo está saludable. En modelos de mamíferos, la extensión reportada también incluye la protección contra distintas enfermedades relacionadas con la edad. Además, los mecanismos de envejecimiento están conservados evolutivamente y muchos de los genes involucrados en este proceso presentan homólogos en levaduras, nematodos, moscas y mamíferos (Partridge *et al.*, 2011).

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico en el estudio del envejecimiento

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo biológico ampliamente utilizado para el estudio del envejecimiento a nivel celular, ya que posee dos tipos de esperanza de vida: la replicativa y la cronológica (Piper, 2006). La esperanza de vida replicativa (RLS, por sus siglas en inglés) se define como el número de células hijas que puede producir una célula madre antes de entrar a la etapa de senescencia, mientras que la esperanza de vida cronológica (CLS, por sus siglas en inglés) es el tiempo que una célula puede sobrevivir una vez que deja de dividirse (Mortimer & Johnston, 1959; Fabrizio & Longo, 2003).

La relación entre ambos tipos de envejecimiento sigue siendo enigmática. Muchos de los genes que incrementan la CLS disminuyen la RLS, posiblemente porque afectan la tasa de crecimiento y no la senescencia (Fabrizio *et al.*, 2004), aunque también se ha demostrado que el envejecimiento cronológico puede reducir la RLS de una célula madre (Ashrafi *et al.*, 1999). Esto indica que hay un traslape entre distintos mecanismos que regulan los dos tipos de envejecimiento.

Las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA son las dos rutas principales proenvejecimiento en la levadura, y promueven la senescencia y muerte celular en ambos modelos de

envejecimiento cronológico y replicativo (Fig. 1). Se puede extender la CLS disminuyendo la actividad de ambas vías de señalización, lo que promueve la actividad de la cinasa Rim15 y de los factores de transcripción Msn2/4 y Gis1 (Fabrizio & Longo, 2003; Wei *et al.*, 2008).

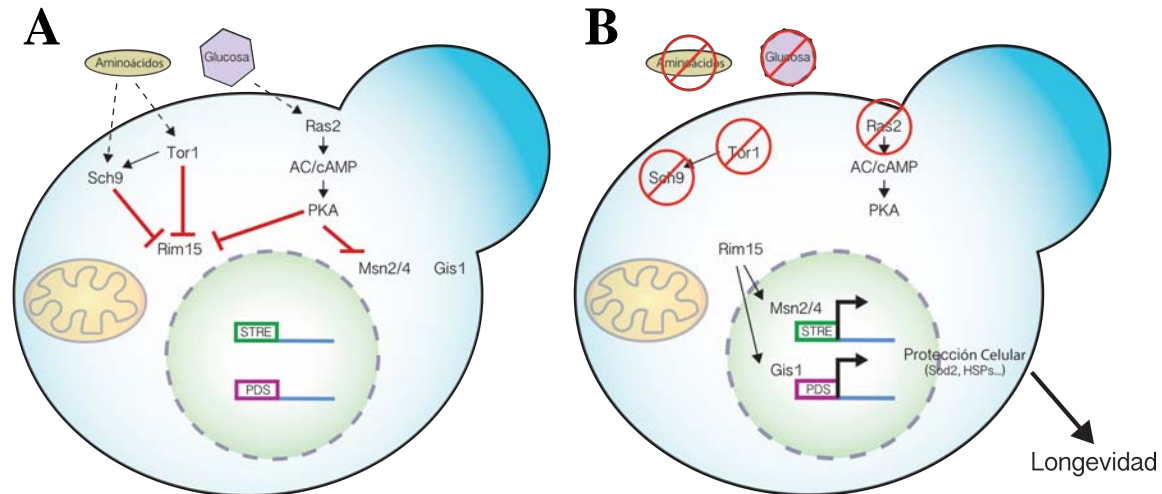


Figura 1. Las principales rutas que regulan la longevidad en *S. cerevisiae*: la vía de TOR y Ras/cAMP/PKA. A) La activación de las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA convergen en la inactivación de Rim15. B) La inhibición de las vías desreprime a Rim15, la cual a su vez activa a los factores de transcripción Msn2/4 y Gis1.

2.2 La vía de señalización de TOR

Una de las rutas de señalización más conservada evolutivamente es la vía de TOR (“Target Of Rapamycin”) que tiene como componente principal a la cinasa Tor y se activa en condiciones de disponibilidad de aminoácidos y nutrientes. En *S. cerevisiae* las proteínas parálogas Tor1 y Tor2 se ensamblan en dos complejos multiproteicos funcionalmente distintos, TORC1 y TORC2. Ambas cinasas se pueden ensamblar en el TORC1, pero sólo Tor2 se encuentra asociada con el TORC2 (Rohde *et al.*, 2008). En contraste, otros organismos estudiados hasta la fecha sólo presentan una proteína TOR que funciona en ambos complejos (Huang & Fingar, 2014). Ambos complejos participan en la regulación de la síntesis de proteínas, la biogénesis ribosomal, el crecimiento celular y la autofagia (Liao *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae*, TORC1 está constituido por las proteínas Kog1, Lst8, Tco89 y Tor1/Tor2 formando un complejo con una masa molecular de 2 MDa aproximadamente (Loewith *et al.*, 2002). Algo particular de este complejo es que es sensible al antifúngico rapamicina, mientras que el TORC2 es insensible a este fármaco. La rapamicina actúa

formando un complejo tóxico con su receptor intracelular FKBP12, los cuales se unen directamente a TORC1 también inhibiendo su función (Schreiber, 1991). En presencia de la rapamicina, todos los componentes de TORC1 coinmunoprecipitan con FKBP12 (Loewith *et al.*, 2002), por lo que la integridad del complejo TORC1 no se compromete por este macrólido a diferencia del TORC1 de mamíferos (Yip *et al.*, 2010).

TORC1 se encuentra asociado principalmente a regiones cercanas a la membrana vacuolar (Sturgill *et al.*, 2008). Debido a que la vacuola es el almacén principal de nutrientes en la célula, la localización de TORC1 podría estar beneficiando su función en la detección de la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, se ha visto que Tor1 se encuentra en el núcleo asociado al locus de rDNA para regular la transcripción del rRNA 35S (Li *et al.*, 2006).

El blanco mejor caracterizado del TORC1 es la cinasa de serina-treonina Sch9, a la cual fosforila en varios residuos de aminoácidos en la región C-terminal (Urban *et al.*, 2007). En condiciones de disponibilidad de nutrientes, TORC1 se encuentra activo y Sch9 fosforilado. Sin embargo, cuando hay una disminución en la concentración intracelular de nutrientes, la función de TORC1 se ve suprimida. La actividad de TORC1 también se ve suprimida en condiciones de estrés, incluyendo estrés osmótico, oxidativo y térmico (Urban *et al.*, 2007), aunque no se conoce cómo esta señal de estrés ambiental se transduce hasta TORC1.

TORC1 controla positivamente el proceso de síntesis de proteínas mediante la regulación de la biogénesis ribosomal vía un aumento en la síntesis de rRNA, proteínas ribosomales, expresión de genes que codifican para tRNAs y procesamiento del rRNA. Además, participa en la estabilidad del mRNA y regula positivamente la actividad de los factores de iniciación de la traducción (De Virgilio & Loewith, 2006). Cuando los niveles de nutrientes disminuyen, la actividad de TORC1 se ve suprimida y los niveles de traducción de proteínas se ven reducidos. La inhibición de la vía promueve un cambio fisiológico hacia el mantenimiento celular, activando la expresión de genes de resistencia a estrés y el proceso de autofagia. Todo esto tiene un impacto en la longevidad del organismo, ya que la inhibición de TORC1 extiende la esperanza de vida en *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus* (Kenyon, 2010).

Una de las funciones de TOR es reprimir la respuesta celular a estrés regulando la localización de los factores de transcripción Msn2/4 (Beck & Hall, 1999). En condiciones de

disponibilidad de nutrientes, Msn2/4 se mantienen localizados en el citoplasma (Fig. 1A), mientras que en condiciones de inanición, estos factores de transcripción se relocalizan en el núcleo resultando en un aumento a la resistencia a estrés oxidativo y térmico (Fig. 2A). Para que ocurra esta relocalización, se necesita que la cinasa Rim15 fosforile a Msn2/4 y éstos se puedan transportar al núcleo. La función de Rim15 es regulada negativamente por TORC1, Sch9 y la Proteína Cinasa A (PKA) (Pedruzzi *et al.*, 2003).

Aunque no se ha demostrado que la activación de Msn2/4 sea suficiente para aumentar la RLS y CLS, se ha observado que la extensión en la longevidad causada por la inhibición de TOR requiere la relocalización de Msn2/4 del citoplasma al núcleo (Medvedik *et al.*, 2007). Además, la sobreexpresión de blancos de Msn2/4 como *SOD1* y *SOD2* son suficientes para aumentar la CLS (Fabrizio *et al.*, 2003). Esto indica que la disminución en la CLS se debe a un aumento en la resistencia a estrés mediada por Msn2/4.

2.3 La vía de señalización de Ras/cAMP/PKA

La ruta de Ras/cAMP/PKA también participa en varios procesos metabólicos regulados por la disponibilidad de nutrientes, en especial de la glucosa. Ambas rutas tienen interacciones funcionales y convergen en la inhibición de la cinasa Rim15 (Fig. 1A). Esta vía controla varios aspectos del crecimiento celular en respuesta a la concentración de nutrientes extracelulares y condiciones de estrés (Pedruzzi *et al.*, 2000). En *S. cerevisiae* existen dos genes *RAS* (*RAS1* y *RAS2*) los cuales son homólogos a los genes *RAS* de mamíferos. Ras1 y Ras2 son proteínas G pequeñas localizadas en la membrana plasmática y su actividad se ve afectada dependiendo del nucleótido al cual se encuentran unidas. La regulación de Ras está dada por el factor intercambiador de nucleótidos de guanina Cdc25 en respuesta a la concentración de glucosa (Lai *et al.*, 1993). Cuando hay altas concentraciones de glucosa, Ras se activa por unión al GTP y promueve un aumento en la concentración de cAMP por medio de la adenilato ciclasa (Cyr1), quien a su vez aumenta la actividad de la PKA. La PKA está compuesta por dos subunidades catalítica y dos reguladoras (Toda *et al.*, 1987). Las isoformas de la subunidad catalítica están codificadas por *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*, los cuales son genes redundantes, mientras que la subunidad reguladora está codificada por *BCY1* (Kuret *et al.*, 1988). En presencia de cAMP, Bcy1 se une al cAMP y libera a las subunidades catalíticas como monómeros activos (Pedruzzi *et al.*, 2000). Por lo tanto, la subunidad

reguladora inhibe la actividad de cinasa de las proteínas Tpk dependiendo de las concentraciones de cAMP, que a su vez es regulado por Ras.

En presencia de glucosa la vía de Ras/cAMP/PKA regula la activación transcripcional de una serie de factores que resultan en el crecimiento del organismo, el cual depende en parte de la inhibición de los factores de transcripción de resistencia a estrés Msn2/4 (Zaman *et al.*, 2009). La inhibición de estos factores es clave para la extensión de la esperanza de vida en las mutantes $\Delta ras2$ y *cyr1::mTn* (Fabrizio *et al.*, 2003), aunque el factor de transcripción Gis1 también parece contribuir al efecto en la disminución de la actividad de Ras/cAMP/PKA sobre la esperanza de vida y la respuesta a estrés (Wei *et al.*, 2008).

2.4 Morfología mitocondrial

Las mitocondrias son organelos dinámicos que están en constante remodelación morfológica mediante procesos de fusión y fisión dependiendo de señales intra y extracelulares (Fig. 2; Nunnari *et al.*, 1997). Esta plasticidad es de suma importancia para varias funciones celulares como la herencia del mtDNA y la distribución intracelular del organelo (Okamoto & Shaw, 2005; Mishra & Chan, 2015). El balance entre las acciones antagónicas de la fusión y fisión son las que determinan la morfología del organelo (Chen & Chan, 2004). Una disminución en la fusión lleva a un aumento en la fragmentación mitocondrial debido a un exceso de fisión, mientras que poca fisión genera una red mitocondrial altamente interconectada en forma de malla (Sesaki & Jensen, 1999). En *S. cerevisiae* se han identificado tres GTPasas que orquestan el proceso de fusión y fisión en conjunto con otras proteínas.

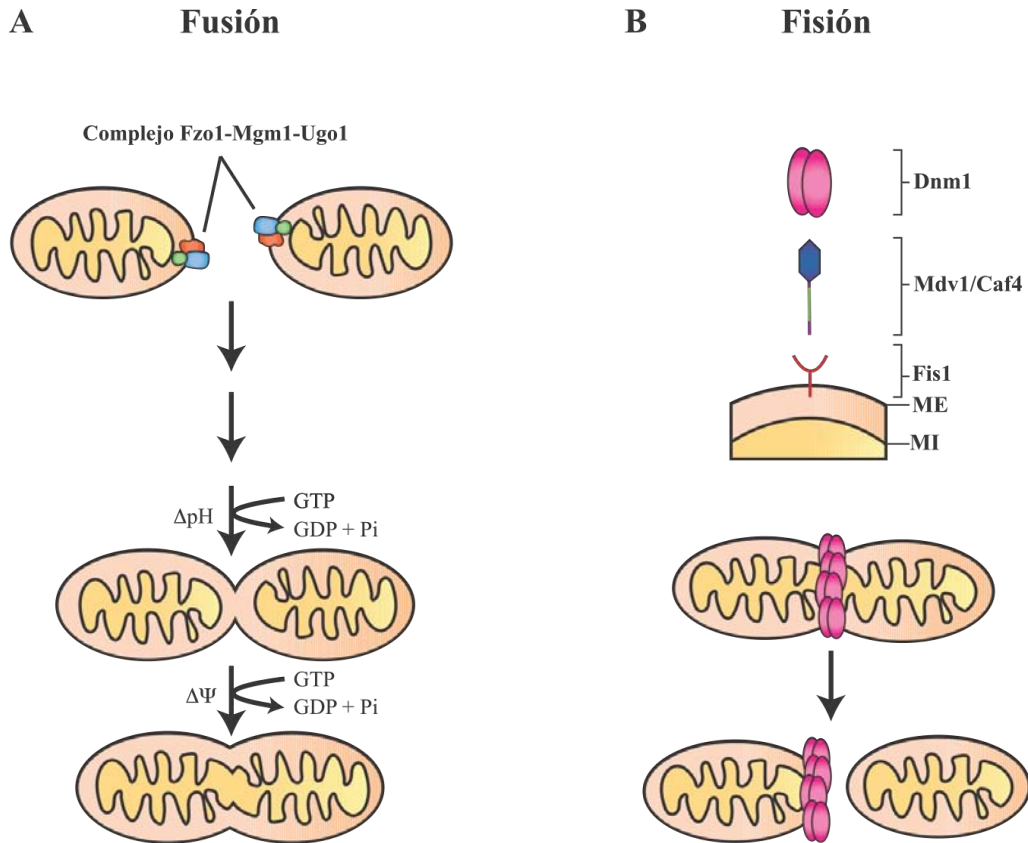


Figura 2. Los procesos de fusión y fisión mitocondrial. (A) La fusión mitocondrial está regulada principalmente por el complejo formado por Fzo1, Mgm1 y Ugo1 (indicadas en azul, verde y rojo, respectivamente), mientras que (B) la fisión está orquestada por Dnm1, las proteínas adaptadoras Mdv1 y Caf4, y el receptor Fis1. Membrana Externa (ME), Membrana Interna (MI), gradiente de protones de la membrana interna (ΔpH), potencial eléctrico de la membrana interna ($\Delta \Psi$). Basado en Okamoto & Shaw (2005) y Detmer & Chan (2007).

La fusión mitocondrial es llevada a cabo principalmente por Mgm1 y Fzo1, encargadas de la fusión de la membrana interna y externa, respectivamente. Fzo1 (“**F**uzzy **o**nions”) es una proteína integral de la membrana externa mitocondrial con su dominio de GTPasa expuesto hacia el citosol. La proteína Mgm1 (“**M**itochondrial **g**enome **m**aintenance”) se presenta en dos formas: una integrada a la membrana interna mitocondrial y una asociada de manera periférica a sus isoformas integrales en el espacio intermembranal. En hongos se ha identificado una tercera proteína que participa en la fusión mitocondrial, Ugo1 (“fusión” en japonés). Esta proteína se encuentra embebida en la membrana externa mitocondrial con su región N-terminal expuesta hacia el citoplasma y el dominio C-terminal hacia el espacio intermembranal (Okamoto & Shaw, 2005).

El primer paso en el proceso de fusión es la formación de un complejo que conecta a las mitocondrias (Fig. 2A). Dos moléculas de Fzo1 de mitocondrias adyacentes se unen mediante su dominio C-terminal formando una hélice súper enrollada (“coiled coil”) dimérica antiparalela (Koshihara *et al.*, 2004). El segundo paso involucra la combinación de las bicapas lipídicas externas de ambas mitocondrias (Weber *et al.*, 1998). Aun no queda claro cómo ocurre este proceso, pero se cree que la unión de estas proteínas funciona como otras maquinarias de fusión de membranas como SNAREs en la vía de secreción (“Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor **att**achment protein **r**eceptors”) o las proteínas virales de fusión (Westermann, 2008). En este caso, Fzo1 podría hidrolizar el GTP y acercar las membranas de las dos mitocondrias hasta tener contacto físico. Mgm1 participa de manera similar en la fusión de la membrana interna mitocondrial formando oligómeros para acercar las membranas lipídicas. Este paso es sensible a la disipación del potencial eléctrico de membrana y funcionalmente independiente de la fusión de la membrana externa (Hoppins *et al.*, 2007).

La actividad de la maquinaria de fusión debe estar coordinada para asegurarse que el organelo mantenga su doble membrana. Para esto es importante la formación de contactos físicos entre la membrana interna y externa para coordinar ambos procesos de fusión. Se ha reportado que la proteína Ugo1 une en su dominio citoplásmico e intermembranal a Fzo1 y Mgm1, respectivamente (Sesaki & Jensen, 2004). La actividad exacta que lleva a cabo Ugo1 sigue siendo enigmática, pero se ha propuesto que posee una función mucho más relevante que un mero andamiaje de las maquinarias de fusión de la membrana externa e interna (Hoppins *et al.*, 2009).

La fisión mitocondrial está coordinada por Dnm1 (“**D**ynam**i**n-related”), Fis1 (“**M**itochondrial **F**ission”), Mdv1/Gag3 (“**G**lycerol-**a**dapted **g**rowth”) y Caf4 (“**C**CR4 **a**ssociated **f**actor”; Fig. 2B). La GTPasa Dnm1 es una proteína citoplásmica soluble que se ensambla en oligómeros en la superficie mitocondrial (Hoppins *et al.*, 2007). Fis1 es una proteína anclada a la membrana que se distribuye de manera homogénea por toda la superficie mitocondrial y funciona como sitio de anclaje para otros factores de fisión (Zhang & Chan, 2007). Las proteínas solubles Mdv1 y Caf4 realizan funciones redundantes favoreciendo la interacción entre Fis1 y Dnm1 (Tieu *et al.*, 2002).

El modelo de división mitocondrial más aceptado plantea a Dnm1 como el factor clave en el proceso de escisión de las mitocondrias (Okamoto & Shaw, 2005). Fis1 funciona como receptor, mientras que Mdv1 y Caf4 funcionan como proteínas adaptadoras que reclutan a Dnm1 en los lugares donde ocurrirá la fisión. El reclutamiento de Dnm1 se da formando espirales y anillos alrededor de la superficie del organelo, y separa a las mitocondrias (Ingerman *et al.*, 2005). La fisión de la membrana interna ha sido menos estudiada, aunque hay autores que plantean que la actividad de Dnm1 es suficiente para escindir ambas membranas mitocondriales de manera simultánea (Westermann, 2008).

2.5 Autofagia

La autofagia es un mecanismo altamente conservado en los eucariontes que se define como un proceso no selectivo de degradación, donde los componentes citoplásmicos son envueltos por vesículas bimembranales llamadas autofagosomas. En este proceso la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la vacuola lo que permite que las hidrolasas vacuolares degraden el contenido y éste pueda ser desechado o reutilizado por la célula para la biosíntesis de otras moléculas (Yorimitsu & Klionsky, 2005). La regulación de la autofagia se da por medio de más de 30 genes llamados *ATG* (“**A**utophagy-related”) y ocurre constitutivamente en niveles bajos (Fig. 3). La autofagia se puede inducir por diferentes condiciones de estrés, como la privación de nitrógeno o aminoácidos, y es necesaria para la extensión en la esperanza de vida mediada por la inhibición de TOR (Hansen *et al.*, 2008).

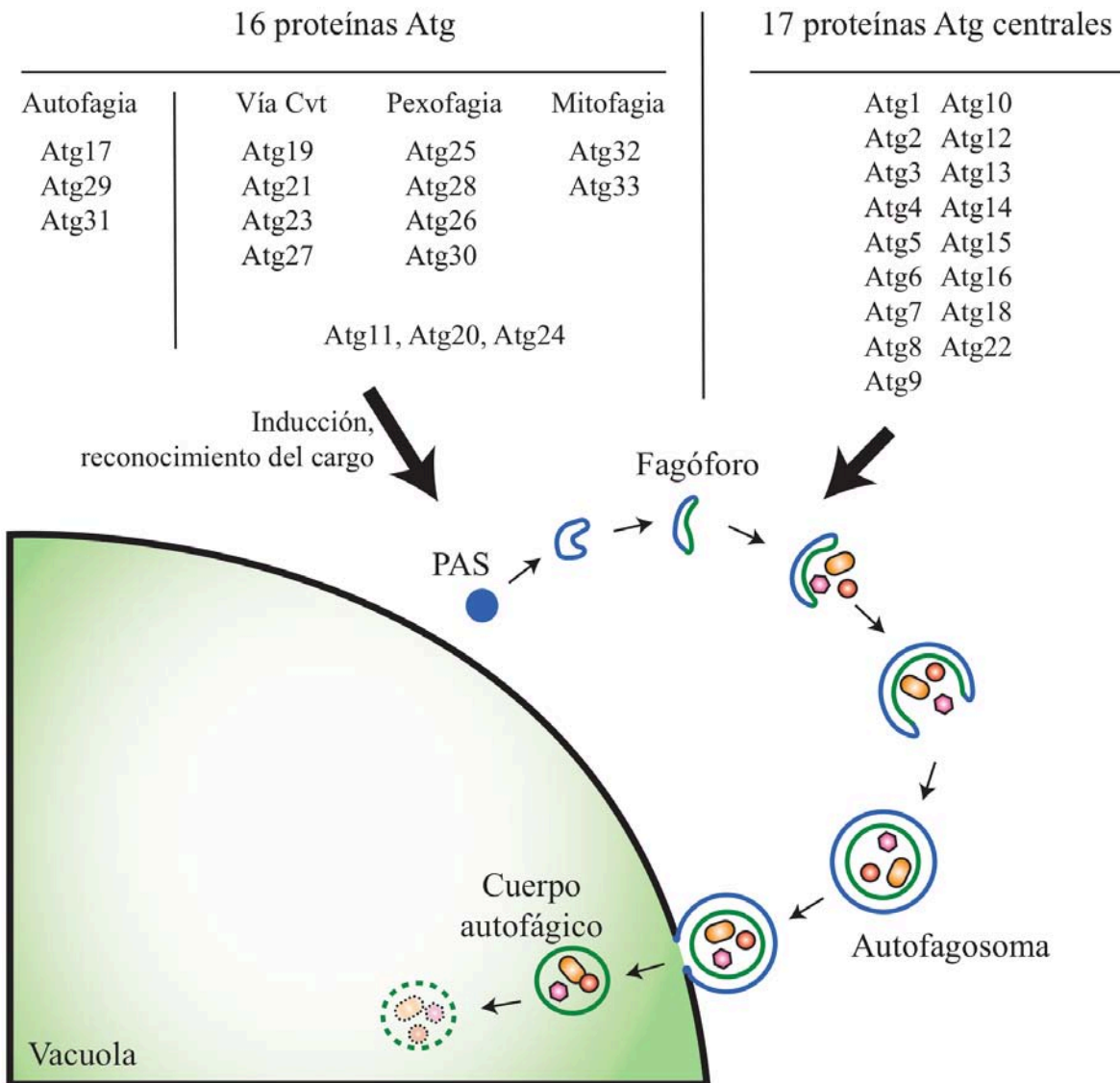


Figura 3. El proceso de autofagia está orquestado por 33 proteínas Atg. Se han identificado 17 proteínas Atg centrales (“core Atg proteins”) en *S. cerevisiae* que participan en todas las rutas relacionadas con la autofagia. Otras 16 proteínas se han identificado por poseer funciones más específicas en distintos tipos de autofagia selectivos, como la degradación de mitocondria (mitofagia), peroxisomas (pexofagia) y la vía Cvt. PAS, sitio de ensamblaje del fagóforo. Basado en Inoue & Klionsky (2010).

La mayoría de las proteínas Atg participan en los primeros pasos de la formación del autofosoma. Éste puede modular su tamaño dependiendo de los sustratos que se van a degradar por medio de la expansión del autofosoma. Varios organelos, incluyendo el retículo endoplásmico, las mitocondrias y el aparato de Golgi pueden funcionar como fuente de membranas para la autofagia (Reggiori *et al.*, 2005). En los pasos iniciales se pueden

encontrar a la mayoría de las proteínas Atg colocalizando en un punto perivacuolar llamado sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS, por sus siglas en inglés).

Atg9 es la única proteína integral de membrana dentro de las proteínas centrales que son requeridas para la biogénesis del autofagosoma (Juhász & Neufeld, 2006.). Aunque la función de esta proteína no ha sido dilucidada del todo, una hipótesis menciona que podría estar funcionando como acarreador que transfiere membranas desde las fuentes donantes hacia el PAS (Inoue & Klionsky, 2010). Las proteínas Atg11, Atg23 y Atg27 están involucradas en el movimiento anterógrado de Atg9 hacia el PAS, mientras que Atg1–Atg13, Atg2–Atg18 y Atg14 son requeridas para el movimiento retrógrado hacia los organelos donantes de membrana (Inoue & Klionsky, 2010).

Atg13 es una de las proteínas Atg centrales que se encarga de percibir las condiciones intracelulares de nutrientes. Cuando hay alta disponibilidad de nutrientes, Atg13 se encuentra altamente fosforilada, mientras que en condiciones de inanición, Atg13 pasa a una versión menos fosforilada. Esta versión tiene una mayor afinidad y regula positivamente la actividad Atg1 (Kamada *et al.*, 2000). Atg1 es una cinasa de serina-treonina cuya función fisiológica juega un rol cambiando de la ruta Cvt (un tipo de autofagia selectiva; “Cytoplasm to vacuole targeting”) hacia el proceso de autofagia general (Inoue & Klionsky, 2010).

Distintas vías de señalización regulan la autofagia en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, incluyendo a las rutas en las que interviene PKA y TORC1, quienes convergen para controlar de manera independiente la actividad de los componentes que inician la formación del autofagosoma (Stephan *et al.*, 2009). La inactivación de TORC1, ya sea por delección del gen *TOR1* o utilizando rapamicina, estimula la inducción de la autofagia inclusive en condiciones donde hay gran disponibilidad de nutrientes (Loewith *et al.*, 2002), por lo tanto, TORC1 funciona como un regulador negativo de la autofagia.

TORC1 fosforila directamente a la proteína Atg13, lo que evita la formación del complejo de iniciación de la autofagia (Kamada *et al.*, 2000). La expresión de mutantes no fosforilables de Atg13 inducen la autofagia por medio de la activación de Atg1, inclusive en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (Inoue & Klionsky, 2010). Estos datos sugieren que Atg13 actúa como un blanco inicial de TORC1 y regula la autofagia dependiendo de la disponibilidad de nutrientes. Adicionalmente, este proceso está regulado por la señalización Ras/cAMP/PKA en *S. cerevisiae*. La PKA es un regulador negativo de la

autofagia ya que puede fosforilar directamente a Atg1 y Atg13, bloqueando la formación del PAS (Stephan *et al.*, 2009; Yorimitsu *et al.*, 2007). La expresión de mutantes constitutivamente activas de Ras inhiben la autofagia inclusive en mutantes de Atg1 que carecen de los sitios de fosforilación de PKA (Budovskaya *et al.*, 2005), por lo que el mecanismo de inhibición mediado por PKA depende de la fosforilación de más de un sustrato. Sch9 también está involucrado en percepción de la disponibilidad de nutrientes. La inactivación de PKA y Sch9 induce la autofagia, mientras que la inactivación de Sch9 por si sola no es suficiente para inducir este proceso. Estos resultados sugieren que la autofagia es regulada de manera negativa por al menos dos rutas paralelas en condiciones de disponibilidad de nutrientes.

3. Antecedentes

La proteína Slm35 (“Stress response and Longevity Mitochondrial factor”, Yjr100c) fue identificada en estudios proteómicos a gran escala como una proteína mitocondrial (Reinders *et al.*, 2006; Vögtle *et al.*, 2009). Hess *et al.* (2009) la describieron con el nombre de Aim25 y observaron que tenía un papel importante durante la biogénesis, organización y herencia de las mitocondrias. En particular, observaron que la delección de *AIM25* producía un incremento en la pérdida del mtDNA en comparación con la cepa silvestre.

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo demostraron que la eliminación del gen *SLM35* no produjo ninguna diferencia observable en el crecimiento en condiciones estándares de laboratorio, referentes a fuentes de carbono fermentables y respiratorias en comparación con la cepa silvestre BY4741 (Fig. 4).

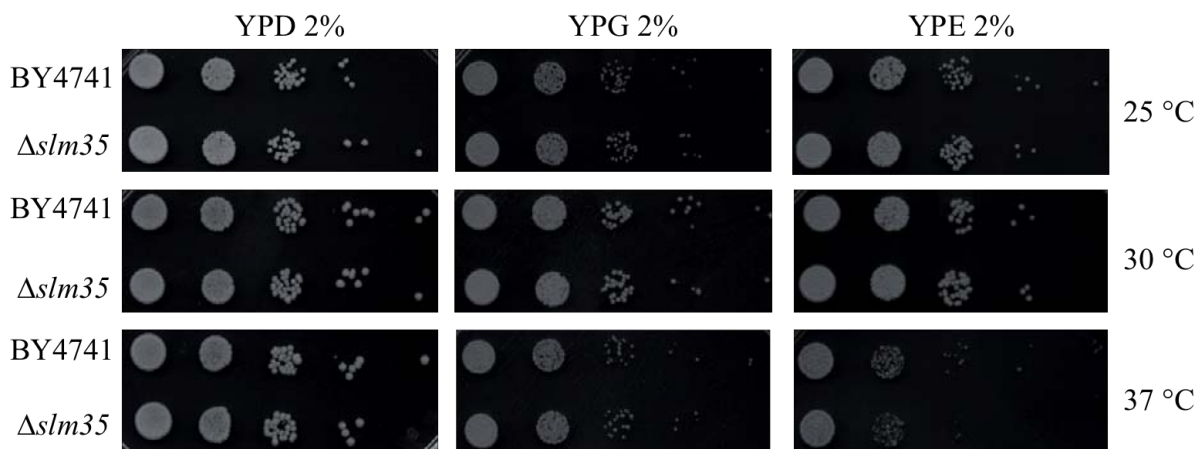


Figura 4. La delección de *SLM35* no presenta un fenotipo observable en condiciones estándares de laboratorio. Ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en medio rico con fuente fermentable (YPD) y no fermentable (YPG/YPE) de carbono, a distintas temperaturas (Aguilar López, 2016).

El gen *SLM35* se encuentra codificado en el genoma nuclear y está constituido por 984 nucleótidos. El producto proteico codificado por este gen es de 327 residuos de aminoácidos, que incluyen una secuencia de importación mitocondrial en el extremo N-terminal (versión precursora con una masa molecular calculada de 37.4 kDa); su versión madura tiene una masa molecular calculada de 35 kDa (Vögtle *et al.*, 2009).

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de Slm35 predice un dominio de escramblasa de fosfolípidos. Las escramblasas pertenecen a una familia de proteínas que translocan bidireccionalmente fosfolípidos de membrana independientemente de ATP (Sahu

et al., 2007). La translocación de fosfolípidos en las membranas celulares es de suma importancia en procesos como la transducción de señales, la coagulación y la apoptosis (Lhermusier *et al.*, 2011; Zachowski, 1993). En humanos se han caracterizado cuatro escramblasas de fosfolípidos homólogas (hPLSCRs) localizadas en distintos compartimentos (*e.g.* membrana plasmática, mitocondria, núcleo). Éstas se expresan de manera diferencial en distintos tejidos, siendo la escramblasa de fosfolípidos 1 (hPLSCR1) la más caracterizada hasta el momento (Wiedmer *et al.*, 2000). En cambio, en la levadura *S. cerevisiae*, Slm35 es la única proteína que se ha propuesto que posea actividad de escramblasa (Sahu *et al.*, 2007).

Un acercamiento para entender los procesos en que Slm35 podría estar interviniendo en *S. cerevisiae* fue el estudio de la región promotora del gen. La expresión de los genes está regulada por la unión de factores de transcripción específicos a elementos regulatorios en su promotor. El análisis de estos elementos y su comparación con otros genes ya descritos presenta una herramienta útil en la caracterización de un gen. En la región promotora de *SLM35* se encontraron tres elementos regulatorios conservados que podrían estar involucrados en la regulación de este gen durante condiciones de estrés y disminución en la tasa de crecimiento de las células. El primero es un elemento de respuesta a estrés (STRE; “**S**tress **R**esponse **E**lement”) a -163 pb en relación al sitio de inicio de la traducción, el cual posee una secuencia consenso CCCCT (Ruis & Schüller, 1995). El segundo es un sitio de unión del complejo HAP2/3/4/5 (HAP) a -544 pb, con la secuencia consenso TNATTGGT (Flattery-O’Brien *et al.*, 1997). Por último, un elemento de cambio post-díauxico (PDS; “**P**ost **D**iauxic **S**hift”) a -678 pb, con la secuencia consenso T(T/A)AGGGAT (Boorstein & Craig, 1990).

La activación o represión de una gran cantidad de genes en la levadura (*e.g.* *SOD2*, *CTT1*, *HSP12*, *IDH1*, *GRE1*) es regulada por la presencia de estos elementos regulatorios durante la limitación de nutrientes y la entrada a la fase estacionaria de crecimiento (Pedruzi *et al.*, 2000). Las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA regulan muchas de estas respuestas mediante la inhibición de Rim15 y sus efectores, los factores de transcripción Msn2/4 y Gis1 (Ruis & Schüller, 1995). Estos datos sugieren que *SLM35* podría estar regulada de manera similar y posiblemente estar participando en procesos de respuesta a estrés y envejecimiento celular.

4. Justificación e Hipótesis

Justificación

Las mitocondrias juegan un papel importante en la regulación del envejecimiento, la respuesta al estrés y la autofagia. Sin embargo, los detalles del mecanismo molecular no están plenamente descritos. Un análisis del promotor de *SLM35* sugiere que este gen podría estar expresándose en condiciones de estrés y la entrada a la fase post-diáuxica de crecimiento. Esto nos permite suponer que la proteína mitocondrial Slm35, que hasta ahora no ha sido caracterizada funcionalmente, está relacionada con el proceso de envejecimiento y la respuesta a estrés, en especial con las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA.

Hipótesis

La proteína Slm35 es un componente mitocondrial de la vía de TOR y/o de la vía de Ras/cAMP/PKA que integra señales relacionadas con los procesos de envejecimiento, respuesta a estrés térmico, dinámica mitocondrial y autofagia.

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el papel de la proteína mitocondrial Slm35 en procesos de respuesta a estrés y envejecimiento como parte de la vía de señalización de TOR y Ras/cAMP/PKA en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos particulares

- Evaluar el fenotipo de una cepa mutante $\Delta slm35$ en condiciones de estrés térmico.
- Determinar si existe interacción genética entre *SLM35* y los genes *AIM33*, *OMA1*, *ETR1*, *GPT2* y *MSN3* en condiciones de estrés térmico.
- Investigar si existe una interacción genética entre *SLM35* y genes de la vía de TOR y Ras/cAMP/PKA durante el estrés térmico y el envejecimiento cronológico.
- Estimar el papel de Slm35 en procesos de dinámica mitocondrial.
- Determinar si la proteína Slm35 afecta la tasa de autofagia inducida por restricción de nitrógeno.

6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados

6.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se originaron a partir de la BY4741 (Tabla I). Las mutantes sencillas fueron obtenidas de la colección Euroscarf (Winzeler *et al.*, 1999). Las mutaciones de los genes se realizaron por recombinación homóloga reemplazando el marco de lectura abierto (ORF) por casetes de resistencia. Para generar a las mutantes sencillas $\Delta sch9$ y $\Delta ras2$ se amplificó por PCR el casete *KanMX4* a partir del plásmido pFA6a (Wach *et al.*, 1994) y luego se transformó en la cepa BY4741. Se realizó una selección con geneticina G418 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gibco). Las dobles mutantes se realizaron a partir de las cepas mutantes sencillas. Se les eliminó el gen *SLM35* reemplazándolo por el casete *hph* amplificado a partir del plásmido pAG32 (Goldstein & McCusker, 1999). Se realizó una selección con Higromicina B (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Invitrogen). Todas las mutantes fueron verificadas mediante PCR.

Tabla I. Cepas utilizadas en el trabajo.

Cepa	Fondo Genético	Genotipo	Referencia
BY4741	S288C	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
$\Delta slm35$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta slm35::KanMX4$</i>	Euroscarf
$\Delta tor1$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta tor1::KanMX4$</i>	Euroscarf
$\Delta sch9$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta sch9::KanMX4$</i>	Este trabajo
$\Delta ras2$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ras2::KanMX4$</i>	Este trabajo
$\Delta rim15$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta rim15::KanMX4$</i>	Euroscarf
$\Delta gis1$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta gis1::KanMX4$</i>	Euroscarf

<i>Δmsn2</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmsn2::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δmsn4</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmsn4::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δsod2</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δsod2::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δccp1</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δccp1::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δaim33</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δaim33::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δomal</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δomal::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δetr1</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δetr1::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δgpt2</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δgpt2::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δmsn3</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmsn3::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δtor1 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δtor1::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δsch9 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δsch9::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δras2 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δras2::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δrim15 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δrim15::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δgis1 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δgis1::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δmsn2 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmsn2::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δmsn4 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmsn4::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δsod2 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δsod2::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo
<i>Δccp1 Δslm35</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δccp1::KanMX4 Δslm35::hph</i>	Este trabajo

$\Delta aim33 \Delta slm35$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta aim33::KanMX4 \Delta slm35::hph$</i>	Este trabajo
$\Delta oma1 \Delta slm35$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta oma1::KanMX4 \Delta slm35::hph$</i>	Este trabajo
$\Delta etr1 \Delta slm35$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta etr1::KanMX4 \Delta slm35::hph$</i>	Este trabajo
$\Delta gpt2 \Delta slm35$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta gpt2::KanMX4 \Delta slm35::hph$</i>	Este trabajo
$\Delta msn3 \Delta slm35$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta msn3::KanMX4 \Delta slm35::hph$</i>	Este trabajo

6.1.2 *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa DH5 α (Promega) de *E. coli* (F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*) para la amplificación de los plásmidos utilizados en este trabajo. Los cultivos se realizaron en medio LB o LB-Ampicilina (100 μ g/mL; ver Anexo 11.1) a 37 °C, para cultivos líquidos se mantuvo en agitación a 250 rpm.

6.1.3 Verificación de cepas mutantes

En la Tabla II se presentan los oligonucleótidos utilizados para corroborar las deleciones de los genes de la colección de mutantes sencillas Euroscarf y las generadas en este trabajo. Para la confirmación de las mutantes se extrajo DNA genómico de la levadura o se realizó PCR de colonia (ver Anexo 11.2). Se amplificó el casete de resistencia (*KanMX4* o *hph*) y además se amplificó el gen para determinar que efectivamente éste hubiera sido reemplazado. El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	95	10.00	30X
Desnaturalización	95	1.00	
Alineamiento	55	1.00	
Extensión	72	2.25	
Extensión final	72	5.00	

La amplificación de los casetes para la delección de los genes *SLM35*, *SCH9* y *RAS2* se utilizó el siguiente programa de PCR:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	95	5.00	30X
Desnaturalización	95	1.00	
Alineamiento	55	1.00	
Extensión	72	1.50	
Extensión final	72	2.00	

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Lon	%CG	T _m	Secuencia (5' – 3')										
HygRev	20	45	58.0	GCA	ATC	GCG	CAT	ATG	AAA	TC				
Kan R	20	55	67.1	GGC	AGT	TCC	ATA	GGA	TGG	CA				
YJR100c promotor	24	45.8	60.9	TTG	TAA	GCC	TAC	CGG	CAA	TAA	GG			
AIM25 sentido	22	36.0	53.0	ATG	CAT	AGA	ACG	GCA	ATA	TTT	C			
AIM25 antisentido	19	52.6	56.6	CTA	CTC	ATC	ATA	GCC	ACC	G				
Tor1_F	22	40.9	62.4	CCT	AAT	TTC	TTG	CTC	AAT	CGT	G			
Tor1_R	20	45	59.2	TTC	CTC	CTT	GTA	ATC	ACT	GG				
Ras2_F	20	50	61.4	CGT	TGT	CTT	CTC	TTA	TCG	CC				
Ras2_R	23	47.8	61.9	CCC	TCA	TAG	CAG	AGT	ATT	CTT	CC			
GIS1_F	20	40	63.9	ATT	TGT	TTC	TTT	GTT	GGG	CG				
GIS1_R	21	42.8	62.8	TTT	GGG	AGG	AAT	GAC	TTT	GAC				
MSN2_F	22	45.4	57.0	GGA	AGA	TCA	CAA	CAG	TAG	TAG	C			
MSN2_R	22	45.4	59.1	AGA	TCC	GCA	CTA	TCT	AAG	ACA	G			
MSN3_F	20	50.0	60.5	ATC	GTA	CCG	TAG	GAA	ACC	AG				
MSN3_R	22	40.9	62.8	TGC	TGT	TGA	ATC	CAA	TAG	AAG	G			
RIM15_F	20	60.0	63.5	GTA	GAG	GTT	CTG	GTG	GGT	GC				
RIM15_R	20	55.0	62.3	GAC	TCC	TGT	GAT	CGT	GTT	CC				
MSN4_F	20	50.0	66.1	TTT	CGC	AAC	TGG	TCA	ACA	GG				
MSN4_R	22	40.9	64.8	TCC	ATT	GAG	AAT	TGA	CCA	AAG	G			

SOD2_F	24	41.6	62.9	ACC	TTA	AAC	CTG	GAC	CAA	TAA	CAC				
SOD2_R	21	47.6	64.1	AGC	AGT	GTT	GAA	TCC	GTT	CAC					
CCP1_F	24	41.6	64.7	TGT	TAC	CAA	TTT	AGG	AAA	GGA	CCC				
CCP1_R	20	60.0	64.0	GCA	GCG	GAG	AAC	AGG	TAG	AG					
SCH9_F	24	41.6	62.7	TTT	ACC	CAC	TCT	CAC	ATA	ATC	ACC				
SCH9_R	21	42.8	63.1	GGC	ACC	ATT	ATT	TGA	TGA	AGC					
Sch9REC_F	62	41.9	82.5	GGC	AAC	TGT	TTA	TAA	GAA	GAA	TAA	GTC	TGA	GAA	
				TTA	TAC	TCG	CCA	GCT	GAA	GCT	TCG	TAC	GC		
Sch9REC_R	61	45.9	90.4	CGA	ATC	TTC	CAC	TGA	CAA	ATT	CGT	CAT	CCA	TGT	
				GTT	GGT	CGT	CGA	TGA	ATT	CGA	GCT	CGT	T		
Ras2 delta For	57	40.0	71.0	AAC	CGT	TTT	CGA	ATT	GAA	AGG	AGA	TAT	ACA	GAA	
				AAA	AAA	CGT	ACG	CTG	CAG	GTC	GAC				
Ras2 delta Rev	60	40.0	72.0	AAA	TAG	TAA	ACA	AAG	CAC	GAA	ATG	AAA	AAT	GAC	
				ACC	GCA	GCA	TCG	ATG	AAT	TCG	AGC	TCG			
YJR100C delta For	64	42.0	72.0	CAA	AAC	AAA	AGA	AGA	TTA	AAG	GTC	AAA	CAT	AAA	
				GGA	TAA	CAC	CGA	CCG	TAC	GCT	GCA	GGT	CGA	C	
YJR100C delta Rev	62	27.0	64.0	GTC	AAA	TAT	GTA	TTT	ACA	GAA	TTC	TTT	TAA	ATA	
				TAT	AAT	TCA	CAT	CGA	TGA	ATT	CGA	GCT	CG		
AIM33_F	22	40.9	59.8	CGG	TAA	TGA	TTG	GTC	GTA	TAA	G				
ETR1_F	20	45.0	57.8	GCT	TTA	GGG	TTA	CGA	AAC	AC					
GTP2_F	19	57.8	66.0	GCA	TCG	ATC	CAA	GCT	CGT	C					
OMA1_F	22	40.9	58.8	AAT	CCT	AAG	TCT	TAC	AGC	ATG	G				

6.1.4 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en el siguiente trabajo se encuentran en la Tabla III con los módulos de selección en levadura y bacterias.

Tabla III. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Selección en bacteria	Selección en levadura	Referencia
pAG32	Ampicilina	Higromicina B	Goldstein & McCusker, 1999
pFA6a	Ampicilina	Geneticina G418	Wach <i>et al.</i> , 1994
pYES2.0	Ampicilina	Auxotrofia por uracilo	Invitrogen
pSLM35	Ampicilina	Auxotrofia por uracilo	Aguilar López, 2016
pSOD2-2HA	Ampicilina	Auxotrofia por uracilo	Ponce Rojas, 2016
pVT100U-mtGFP	Ampicilina	Auxotrofia por uracilo	Westermann & Neupert, 2000
GFP-ATG8	Ampicilina	Auxotrofia por uracilo	Suzuki <i>et al.</i> , 2001

6.2 Transformación de levadura

Las transformaciones de levadura se realizaron como fue descrito por Gietz & Woods (2002). Las cepas se incubaron toda la noche en medio rico YPD (ver Anexo 11.1). Al día siguiente se midió la densidad óptica (OD_{600}) y se diluyó a una OD_{600} de 0.1 – 0.3. Se dejaron creciendo hasta una OD_{600} de 0.7 – 1.0. Se tomaron 1.5 mL del cultivo y se colectaron las células por centrifugación a $8,600 \times g$ por 2 min. Se lavaron las células con 1 mL de agua estéril, centrifugando nuevamente a $8,600 \times g$ durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de acetato de litio (CH_3COOLi) 0.1 M. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron las muestras a $8,600 \times g$ durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Se le agregaron los siguientes reactivos en el orden enlistado: 240 μL de PEG 3500 (polietilenglicol) al 50% (m/V), 36 μL de acetato de litio (CH_3COOLi) 1.0 M, 10 μL de DNA de esperma de salmón fragmentado por sonicación 10 mg/mL (previamente calentado a $96^\circ C$ por 10 min), y 5 μL de plásmido (0.1 a 1 μg) o 45 μL de producto de PCR para delección del ORF. El volumen final fue de 360 μL . Se

incubaron las células con los reactivos a 42 °C por 45 min. Luego se centrifugaron a 8,600 \times g durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 100 μ L de agua estéril y se sembraron en medio de selección. En el caso de transformación para realizar las mutantes sencillas, primero se estriaron en medio sólido YPD y luego se replicaron a medio YPD con el antibiótico específico. Las transformaciones para las dobles mutantes primero se estriaron en medio YPD con geneticina G418 (400 μ g/mL; Gibco) y luego se replicaron en medio YPD con geneticina G418 (400 μ g/mL; Gibco) e higromicina B (200 μ g/mL; Invitrogen). Finalmente se incubaron a 30 °C de 2 a 3 días.

6.3 Transformación de *E. coli*

Las transformaciones de *E. coli* DH5 α se realizaron por choque térmico. A 50 μ L de células competentes se le agregaron de manera independiente 100 ng de los plásmidos utilizados (Tabla III). Se realizó una incubación en hielo durante 30 min, seguidos de un choque por calor a 42 °C por 1.5 min y una incubación en hielo por 2 min. Luego se añadió 1 mL de medio LB y se incubaron de 1 a 3 h a 37 °C en agitación a 250 rpm. Se centrifugaron las células durante 3 min a 16,870 \times g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en el medio residual. Se estriaron las células en medio de selección y se incubaron toda la noche a 37 °C.

6.4 Extracción de DNA genómico de levadura

Se realizó extracción de DNA genómico (Amberg *et al.*, 2005) de las cepas utilizadas para confirmar, mediante PCR, cada mutación de manera individual. Para esto se crecieron las cepas en medio líquido YPD por 16 h, se tomaron 1.5 mL del medio y fueron colectadas las células por centrifugación a 8,600 \times g durante 2 min. Se realizó un lavado con 1 mL agua desionizada centrifugando a 8,600 \times g durante 2 min. Se resuspendió el botón celular en 200 μ L de amortiguador de lisis (Tritón X-100 al 2% (V/V), SDS al 1% (V/V), NaCl 100 mM, Tris-HCl 1 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) y se agregaron 200 μ L de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). La muestra se puso en agitación constante durante 3 min y luego se centrifugó a 16,870 \times g por 5 min. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó un décimo del volumen de acetato de sodio (CH₃COONa) 3 M

pH 4.9 y 3 volúmenes de etanol al 96%. Se incubó la muestra por 2 h a -20 °C y luego se centrifugó a 18,188 \times g a 4 °C durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 1 mL de etanol al 70%. Subsecuentemente se centrifugó a 18,188 \times g a 4 °C durante 1 min. Se quitó el excedente de etanol y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el botón en 50 μ L de agua desionizada.

6.5 Extracción de DNA extracromosomal de *E. coli*

A partir de colonias aisladas se inocularon cultivos líquidos en LB-Ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C durante 16 h en agitación a 250 rpm. Se tomó 1 mL del cultivo y se colectaron las células por centrifugación a 16,870 \times g durante 5 min. Se realizó un lavado del botón celular con 1 mL de agua desionizada centrifugando a 16,870 \times g rpm durante 5 min. Se resuspendió el botón con 50 μ L de agua y se le añadieron 300 μ L de amortiguador TENS (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 1 mM, NaOH 100 mM, SDS 0.5% (m/V)). Luego se agitó vigorosamente y se le agregaron 150 μ L de acetato de sodio (CH₃COONa) 3 M pH 4.9 y se centrifugaron las muestras a 18,188 \times g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se le agregaron 900 μ L de etanol al 96% y se centrifugó la muestra a 18,188 \times g durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado del botón con 250 μ L de etanol al 70% centrifugando las muestras a 18,188 \times g durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante 30 seg a 8,600 \times g a temperatura ambiente. Se quitó el excedente de etanol, se secaron los botones y se resuspendió con 100 μ L de agua desionizada.

Se utilizó el kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* de Promega para extracciones mayores a 100 mL de cultivo siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.6 Ensayo de estrés térmico

Los ensayos de crecimiento por diluciones seriadas se realizaron en medio sólido con fuente de carbono fermentable (glucosa, YPD) o no fermentable (glicerol, YPG). Se inocularon los cultivos en el medio indicado durante toda la noche a 30 °C en agitación a 250 rpm, y luego se diluyeron a una OD₆₀₀ de 0.05-0.1. Se crecieron hasta fase logarítmica (14-16 h) o fase estacionaria (3 días) de crecimiento. Se tomó la cantidad correspondiente para tener una OD₆₀₀ de 0.5 de cada cultivo y se realizaron diluciones seriadas 1:10. Se colocaron

3 μL de cada dilución en cajas con medio sólido y luego se incubaron a 55 °C durante el tiempo indicado. Finalmente se transfirieron a 30 °C y se dejaron creciendo de 1 a 3 días.

6.7 Extracción de proteínas totales de *S. cerevisiae*

Se crecieron a las cepas en medio SCD-Ura con 2% o 0.5% de glucosa toda la noche a 30 °C en agitación a 250 rpm. Luego se diluyeron a una OD_{600} de 0.05-0.1 y se dejaron creciendo hasta fase logarítmica (14-16 h) o fase estacionaria (3 días) de crecimiento. Se tomó el volumen necesario para tener 4.0 OD de cada muestra y se colectaron las células por centrifugación a 16,870 $\times g$ durante 2 min. Luego se realizó un lavado con agua desionizada y el botón celular se resuspendió en 250 μL de Tris 50 mM pH 8.0 y se agregaron 50 μL de solución Rödel (NaOH 10 M, PMSF 20 mM, β -mercaptoetanol 7.4% (V/V)). Se incubaron las muestras durante 10 min en hielo y luego se agregaron 60 μL de ácido tricloroacético al 72% (V/V). Se incubaron las muestras durante un mínimo de 30 min a -20 °C. Luego del periodo de incubación se centrifugaron las muestras a 16,870 $\times g$ durante 30 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 mL acetona a -20 °C. Se centrifugaron las muestras a 16,870 $\times g$ durante 30 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendieron las muestras en 100 μL de amortiguador de carga LAE (Tris-HCl pH 6.8, glicerol 10% (V/V), SDS 2% (m/V), β -mercaptoetanol 5% (V/V), azul de bromofenol 0.02% (m/V)).

6.8 Inmunorréplica tipo Western

6.8.1 Electroforesis de proteínas

Las proteínas se separaron por su peso molecular mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 17.5%. Se cargaron 12 μL por muestras en una cámara de electroforesis vertical con amortiguador de corrida (glicina 385 mM, Tris-HCl pH 8.4 50 mM, SDS 0.1% (m/V)) y se corrieron a 150 V y 30 mA por gel.

6.8.2 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore). Se realizó en una cámara de electrotransferencia húmeda con amortiguador de transferencia (glicina 192 mM, Tris 24.76 mM, SDS 0.1% (m/V), metanol

20% (V/V)) a 120 V y 380 mA por 1 h a 4 °C. Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.2% (m/V), ácido tricloroacético 3% (m/V)) para determinar la eficiencia del proceso y comparar cualitativamente a las muestras.

6.8.3 Detección por quimioluminiscencia

Las condiciones de bloqueo de la membrana de nitrocelulosa y uso de los anticuerpos correspondientes se encuentran indicados en la Tabla IV. Todos los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo (leche en polvo baja en grasa (Nestlé) al 5% (m/V) en TBS) y se incubaron a 4 °C en agitación. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Millipore). Posteriormente, se expusieron a una película *Biomax XAR* (Kodak).

Tabla IV. Condiciones de los anticuerpos utilizados para la inmunodetección.

Anticuerpo	Dilución	Bloqueo previo	Tiempo de incubación
α -HA (Roche)	1:3,000	Toda la noche	2 h
α -Hog1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:1,000	30-40 min	Toda la noche
α -IgG (Roche)	1:3,000	-	2 h
α -GFP (LifeSpan BioSciences, Inc.)	1:1,000	30 min	Toda la noche
α -G6PDH (Sigma-Aldrich)	1:10,000	2 h	2 h

6.9 Curvas de envejecimiento cronológico

6.9.1 Preparación de los cultivos

Se realizaron las curvas de envejecimiento cronológico por sobrecrecimiento de células envejecidas (Murakami & Kaerberlein, 2009). Se pusieron cultivos toda la noche de las cepas en medio SCD 2% a 30 °C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente se diluyeron los cultivos a 0.1 OD₆₀₀ en medio SCD 2% y se dejaron creciendo a 30 °C en agitación a 250 rpm durante 3 días. A partir de los 3 días se considera el día 0 de la fase estacionaria de crecimiento. Se realizaron tres réplicas biológicas y por cada cultivo se realizaron dos réplicas técnicas.

6.9.2 Medición de viabilidad de las células envejecidas

Se midió la viabilidad de los cultivos envejecidos durante los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 18 y 23. Para esto se utilizó una placa Honeycomb de 100 pozos y se diluyeron 10 μL de cada cultivo con 290 μL de medio YPD. Las placas inoculadas se colocaron en un crecínómetro Bioscreen C utilizando las siguientes condiciones:

- Temperatura: 30 °C
- Duración del experimento: 1 día, 0 h, 0 seg
- Lectura: cada 30 min
- Filtro: 600 nm, Brown
- Agitación: Normal, Continua, Alta

6.9.3 Análisis de los datos

Los datos obtenidos de las curvas de crecimiento de todas las cepas fueron convertidos a formato compatible con Microsoft Excel. Se eliminó a cada celda la medida de absorbancia del medio YPD y se procedió a calcular el tiempo de duplicación (δ_n) de cada cepa utilizando la siguiente fórmula:

$$\delta_n = \frac{\ln(2)}{\left(\frac{\ln(OD_2) - \ln(OD_1)}{t_2 - t_1}\right)}$$

donde OD_1 y OD_2 representan mediciones de densidad óptica sucesiva, y t_1 y t_2 los tiempos en los que se tomó cada medida. Se calculó el tiempo de duplicación sólo entre valores de 0.4 a 0.6 de densidad óptica. El promedio de estos valores se considera el tiempo de duplicación para cada cepa en el día indicado.

Luego se calculó el cambio en el tiempo (Δt) en la curva de crecimiento para cada día de muestra relativo al día 0. Para esto se determinó la diferencia que le toma a cada cepa llegar a una OD de 0.5 entre el día 0 y el punto subsecuente. El tiempo en que cada cepa llegó a 0.5 de densidad óptica se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal como función del tiempo utilizando los puntos que flanquean a 0.5.

Adicionalmente, se calculó para cada día de medición la fracción de células sobrevivientes. El día 0 corresponde al 100% de viabilidad. Para cada punto subsecuente se calculó la supervivencia en porcentaje utilizando la ecuación:

$$s_n = \frac{1}{2^{\left(\frac{\Delta t_n}{\delta_n}\right)}} \times 100$$

donde s_n es el porcentaje de supervivencia, Δt_n es el cambio en el tiempo, y δ_n es el tiempo de duplicación. Las curvas de supervivencia se generaron a partir de graficar estos datos en función del tiempo.

6.10 Análisis de la morfología mitocondrial por microscopía confocal

Las cepas fueron transformadas con el plásmido pVT100U-mtGFP para visualizar la red mitocondria mediante microscopía de fluorescencia (Westermann & Neupert, 2000). Se crecieron en medio SCD-Ura 2% a 30 °C hasta la fase logarítmica (14-16 horas) o fase estacionaria (3 días). Se tomaron 5 μ L de cada cultivo de manera individual y se transfirieron a un portaobjetos con 5 μ L de glicerol al 100%. Las células se visualizaron con el microscopio confocal FV10i (Olympus) utilizando el objetivo de inmersión en agua 60X.

El análisis de morfotipos se realizó utilizando como base a Bernhardt *et al.* (2015). Se observaron cuatro morfotipos: lineal, filamentoso, intermedio y fragmentado. La cantidad de morfotipos por cepa y condición se obtuvo contando manualmente cada célula de manera independiente. Se sumaron los resultados de dos experimentos independientes por cada cepa y condición para obtener los porcentajes de los morfotipos. *Fase logarítmica* BY4741 n=364; $\Delta slm35$ n=340, $\Delta tor1$ n=346, $\Delta sch9$ n=360, $\Delta ras2$ n=368, $\Delta tor1 \Delta slm35$ n=350, $\Delta sch9 \Delta slm35$ n=352, $\Delta ras2 \Delta slm35$ n=362. *Fase estacionaria* BY4741 n=350; $\Delta slm35$ n=344, $\Delta tor1$ n=349, $\Delta sch9$ n=367, $\Delta ras2$ n=366, $\Delta tor1 \Delta slm35$ n=353, $\Delta sch9 \Delta slm35$ n=274, $\Delta ras2 \Delta slm35$ n=365.

6.11 Ensayo de autofagia por restricción de nitrógeno

Se transformaron a las cepas con el plásmido GFP-ATG8 (pRS316-*GFP-ATG8*; Suzuki *et al.*, 2001) que expresa a la proteína Atg8 fusionada en la región N-terminal a la GFP. Las cepas se crecieron en medio SCD-Ura 2% durante toda la noche a 30 °C en agitación a 250 rpm. Luego se diluyeron a una OD₆₀₀ de 0.3 en 10 mL de medio SCD-Ura 2% y se dejaron creciendo por 5 h. Se recolectaron las células centrifugando a 3,082 \times g durante 5 min y se realizó un lavado con 10 mL de medio de inducción SD(-N). Finalmente,

se resuspendieron en 10 mL de medio de inducción SD(-N) y se extrajo proteína total en los días indicados. Las proteínas se corrieron en geles SDS-PAGE al 17.5%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectó utilizando el anticuerpo policlonal α -GFP conjugado a la peroxidasa (1:1,000; LifeSpan BioSciences, Inc.). Como control de carga se utilizó al anticuerpo de conejo monoclonal G6PDH (1:10,000; Sigma-Aldrich).

7. Resultados

7.1 Efecto de la delección de *SLM35* sobre la respuesta a estrés térmico

El análisis del promotor de *SLM35* sugiere que la proteína codificada por este gen podría estar involucrada en procesos de respuesta a estrés debido a la presencia de los elementos regulatorios STRE, PDS y HAP. Los elementos PDS regulan la activación transcripcional de genes durante el crecimiento diáuxico y la fase estacionaria, y durante estrés térmico (Boorstein & Craig, 1990; Werner-Washburne *et al.*, 1993). Los STRE regulan la expresión de genes durante una gran variedad de insultos celulares, como el estrés oxidativo, térmico, osmótico y en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Marchler *et al.*, 1993; Ruis & Schüller, 1995).

Para probar esta hipótesis utilizamos una cepa mutante $\Delta slm35$ para realizar un ensayo de estrés térmico en fase estacionaria de crecimiento (Fig. 5). Para esto se realizaron diluciones seriadas en medio medio sólido y luego fueron sometidas a 55 °C durante 230 min. Encontramos que la delección de *SLM35* aumentó la resistencia a estrés térmico en comparación con la cepa silvestre BY4741. Este fenotipo se obtuvo tanto en medio fermentativo (YPD) como medio respiratorio (YPG). El aumento en la resistencia a estrés es específico por la eliminación del gen *SLM35*, ya que la complementación con el plásmido pSLM35 (pYES2.0-pr^{GAL1}-*SLM35*) restauró la sensibilidad a estrés térmico.

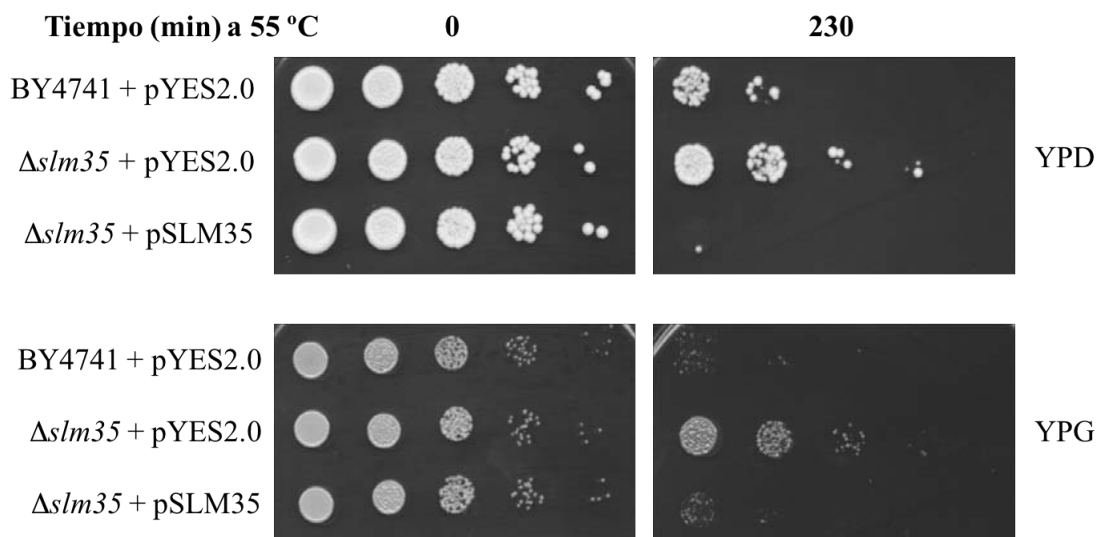


Figura 5. La delección de *SLM35* aumenta la resistencia a estrés térmico. Las cepas se crecieron hasta fase estacionaria de crecimiento (3 días) en medio SC-Ura con galactosa al

2%. Posteriormente, se realizó un ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en medio YPD/YPG y se sometieron a estrés térmico a 55 °C durante 230 min. Las cepas BY4741 y $\Delta slm35$ están transformadas con el plásmido vacío pYES2.0.

7.2 Búsqueda de interacciones genéticas de *SLM35*

En *S. cerevisiae* se han descrito una gran variedad de mecanismos moleculares que son activados en condiciones de estrés (Ruis & Schüller, 1995; Morano *et al.*, 2012). Con el fin de determinar en qué ruta está involucrada *Slm35*, se buscó identificar genes que se expresen en las mismas condiciones que *SLM35* analizando datos de coexpresión publicados como hibridaciones de microarreglos en Affymetrix YG_S98 (Jaimes-Miranda, datos no publicados). De los genes identificados en este análisis se seleccionaron algunos como *AIM33*, *OMA1*, *ETR1*, *GPT2* y *MSN3* debido a su localización celular y a su función reportada (<http://www.yeastgenome.org/>).

Al igual que *SLM35*, la eliminación del gen *AIM33* altera la herencia y biogénesis mitocondrial en *S. cerevisiae* (Hess *et al.*, 2009). No hay ningún reporte sobre la función de *AIM33*, pero en estudios de interacciones genéticas a escala genómica identificaron una posible relación con *SLM35* (Costanzo *et al.*, 2010). La metalopeptidasa *Oma1* se encuentra ubicada en la membrana interna mitocondrial y se ha relacionado con el mantenimiento de la estabilidad de los supercomplejos respiratorios y la respuesta adaptativa a una gran variedad de insultos celulares (Kaser *et al.*, 2003; Bohovych *et al.*, 2015). *Etr1* es una 2-enoil-tioester reductasa de localización mitocondrial, donde se ha sugerido que tiene un rol en la síntesis de ácidos grasos (Torkko *et al.*, 2001; Miinalainen *et al.*, 2003). La proteína *Gpt2* es una glicerol-3-fosfato/dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa que se localiza en las partículas lipídicas y en el retículo endoplásmico. Esta proteína participa en la primera reacción de la síntesis *de novo* del ácido fosfatídico, el cual es importante para la formación de glicerofosfolípidos y triacilgliceroles (Zheng & Zou, 2001; Pagac *et al.*, 2012). Adicionalmente, Costanzo *et al.* (2009) también reportaron una interacción genética entre *GPT2* y *SLM35*. Finalmente, la proteína nuclear *Msn3* (también llamada *Std1*) se ha reportado que participa en la expresión de genes regulados por glucosa (Hubbard *et al.*, 1994).

Para identificar si estos genes tienen una interacción funcional con *SLM35*, se realizaron dobles mutantes de los genes *AIM33*, *OMA1*, *ETR1*, *GPT2* y *MSN3* en conjunto

con la eliminación de *SLM35* (Figura 6A). Las mutantes sencillas y dobles fueron sometidas a estrés térmico (55 °C durante 200 y 245 min) en fase logarítmica de crecimiento para analizar si hay interacción genética. No se encontró ninguna interacción genética mediante la técnica de crecimiento por goteo entre *SLM35* y los genes probados. Muchos genes que son regulados por elementos PDS y STRE son activados en condiciones de RC (Wei *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2009). El protocolo de RC comúnmente utilizado en *S. cerevisiae* implica una reducción en la concentración de glucosa del medio de cultivo de 2% a 0.5%. Se probó si *SLM35* presentaba interacción genética con los genes *AIM33*, *OMAI*, *ETR1*, *GPT2* y *MSN3* durante RC (Fig. 6B). Tampoco se encontró ninguna diferencia en el crecimiento en estrés térmico (55 °C durante 200 y 245 min) de las dobles mutantes en comparación con las mutantes sencillas.

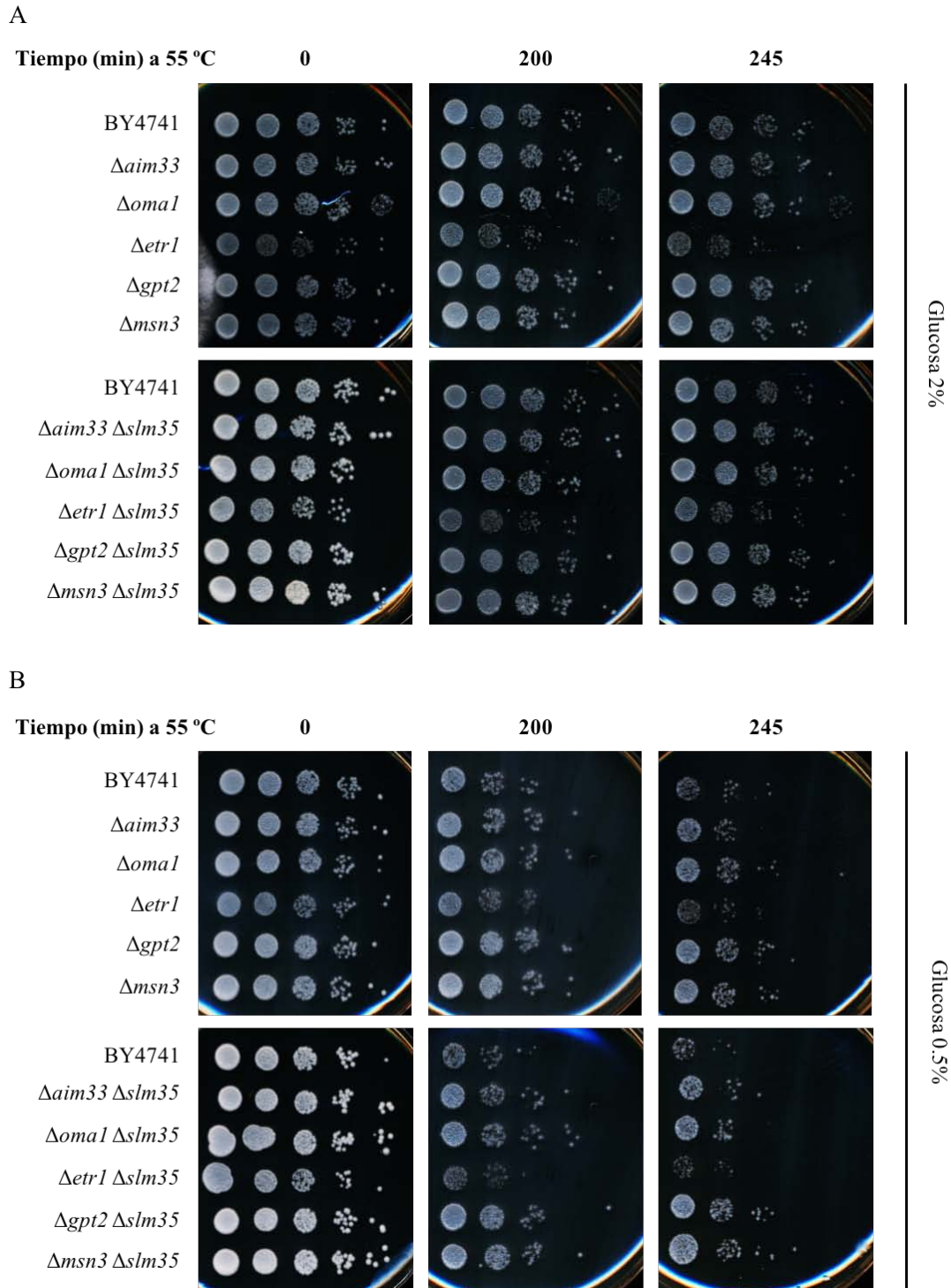


Figura 6. *SLM35* no presenta interacción genética con los genes *AIM33*, *OMA1*, *ETR1*, *GPT2* y *MSN3*. Las cepas se crecieron hasta fase logarítmica de crecimiento (4-5 h) en medio SCD con glucosa al 2% (A) o 0.5% (B). Posteriormente, se realizó un ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en medio YPD y se sometieron a estrés térmico a 55 °C durante 200 y 245 min.

7.3 Relación funcional entre *SLM35* y genes de las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA

Los activadores transcripcionales Msn2/4 son requeridos para la expresión de genes que están bajo los elementos regulatorios STRE y se unen a estas secuencias *in vitro* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996), mientras que el factor de transcripción Gis1 se une preferentemente a los elementos PDS (Pedruzzi *et al.*, 2000). Estos tres factores son regulados negativamente por las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA mediante la inhibición de la cinasa Rim15. Primero evaluamos si *SLM35* presentaba interacción genética con los elementos río abajo de estas vías: *GIS1*, *MSN2* y *MSN4*. Adicionalmente, se probaron dos genes, *SOD2* y *CCPI*, los cuales codifican para enzimas antioxidantes mitocondriales que son reguladas transcripcionalmente por Msn2/4 y Gis1 (Fabrizio *et al.*, 2003; Macisaac *et al.*, 2006; Venters *et al.*, 2011). Para esto, se obtuvieron levaduras dobles mutantes de los genes antes mencionados en conjunto con *SLM35* y se sometieron a estrés térmico en la fase logarítmica de crecimiento. Las dobles mutantes en conjunto con *SLM35* presentaron una mayor sensibilidad a estrés térmico (55 °C durante 245 min) en comparación con las cepas mutantes sencillas, en condiciones de disponibilidad de nutrientes (Fig. 7A). Sin embargo, no se pudo determinar una interacción genética de *SLM35* con estos genes en condiciones de RC (Fig. 7B).

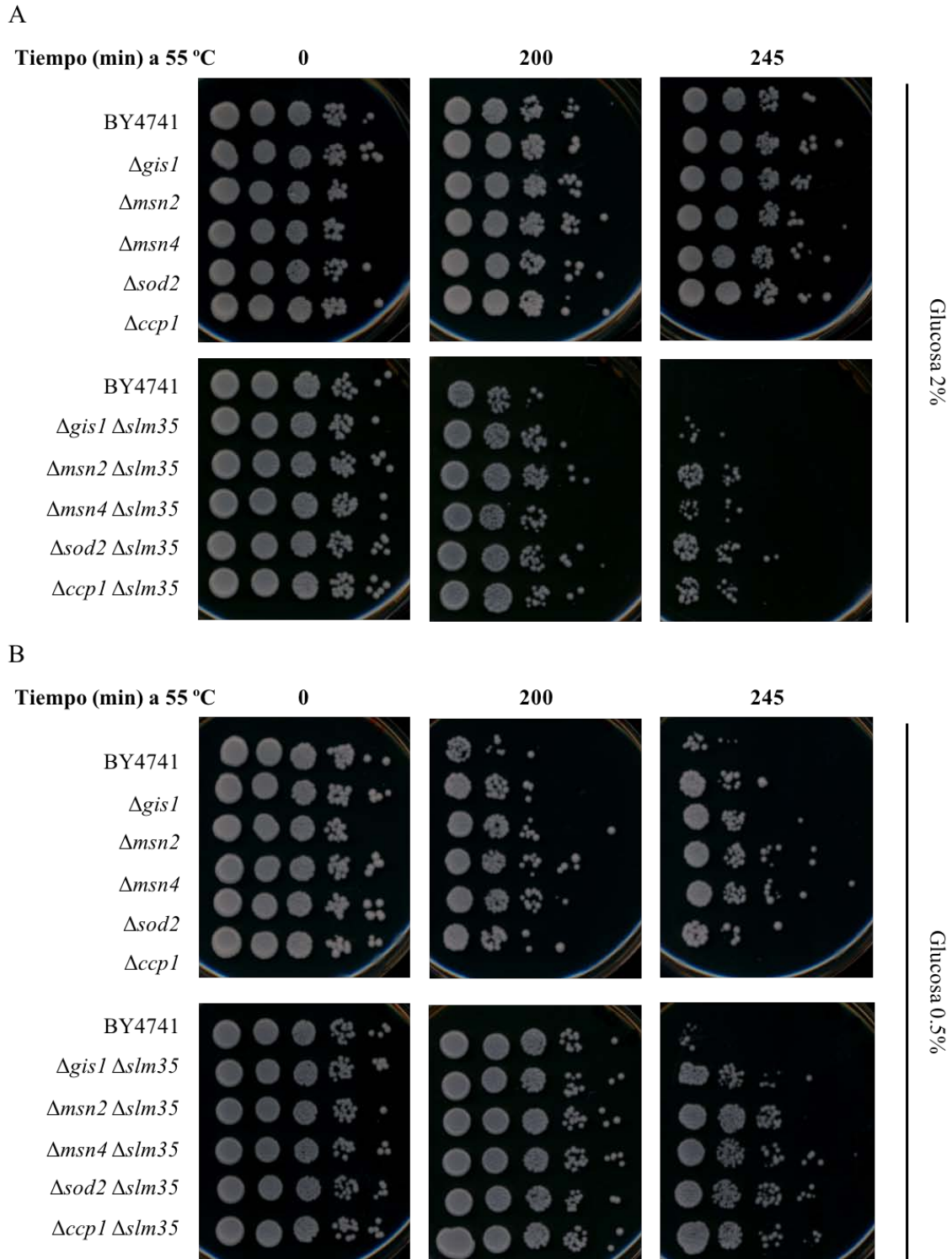


Figura 7. *SLM35* no presenta interacción genética con los elementos río abajo de las vías de TOR y Ras/cAMP/PKA. Las cepas se crecieron hasta fase logarítmica de crecimiento (4-5 h) en medio SCD con glucosa al 2% (A) o 0.5% (B). Posteriormente, se realizó un ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en medio YPD y se sometieron a estrés térmico a 55 °C durante 200 y 245 min.

También se evaluó de manera similar la relación entre *SLM35* y los genes río arriba de la vía *TOR1*, *SCH9*, *RAS2* y *RIM15*. En la Figura 8 se muestra que la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ no puede contener contra el estrés térmico (55 °C durante 230 min), presentando una interacción genética sintética negativa. Este fenotipo sólo se observó en la delección simultánea de *SLM35* y *TOR1*, lo que indica que esta interacción es independiente de *RAS2* y de otros factores río abajo en la vía como *SCH9* y *RIM15*.

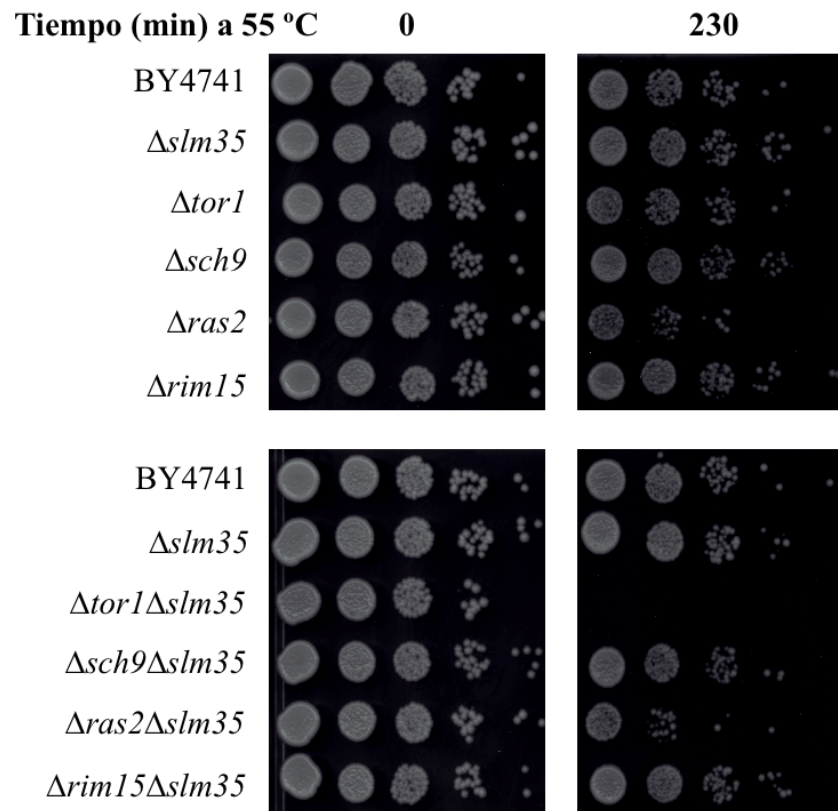


Figura 8. *SLM35* tiene interacción genética con *TOR1* en condiciones de estrés térmico. Las cepas se crecieron hasta fase logarítmica de crecimiento (4-5 h) en medio SCD 2%. Posteriormente, se realizó un ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en medio YPD y se sometieron a estrés térmico a 55 °C durante 230 min.

7.4 Extensión en la esperanza de vida mediada por Tor1 y su relación con Slm35

La habilidad de un organismo a responder de manera efectiva contra un estrés exógeno se relaciona con la esperanza de vida. Se ha reportado que distintas mutaciones que aumentan la esperanza de vida están correlacionadas con un aumento en la resistencia a distintos tipos de estrés ambiental (Oh *et al.*, 2015; Cai & Wei, 2016). Debido a la incapacidad de la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ decidimos evaluar la CLS en esta mutante. Para esto se crecieron las cepas mutantes $\Delta slm35$, $\Delta tor1$ y $\Delta tor1 \Delta slm35$ hasta fase estacionaria y se tomaron alícuotas de los cultivos envejecidos durante 23 días. Se realizaron curvas de crecimiento de estas subpoblaciones para determinar el porcentaje de supervivencia en los distintos días (Murakami & Kaeberlein, 2009). La eliminación de los genes *SLM35* y *TOR1* no afectó la esperanza de vida en comparación con la cepa silvestre BY4741 (Fig. 9). Se ha reportado que la inhibición de la señalización de *TOR1* extiende la longevidad (Powers III *et al.*, 2006); sin embargo, existen diferencias entre los fondos silvestres de levadura utilizados comúnmente en los laboratorios. Nuestros resultados indican que la delección de *TOR1* en el fondo genético BY4741 no tiene un efecto sobre la extensión de la esperanza de vida cronológica en *S. cerevisiae*, lo que concuerda con lo reportado por Garay *et al.* (2014). Este efecto puede ser debido a la poca capacidad respiratoria que posee esta cepa en comparación con la cepa W303 o DBY746 (Ocampo *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2009). Adicionalmente, encontramos que la delección simultánea de *TOR1* y disminuye la esperanza de vida media en un 86% en comparación con la cepa silvestre y las mutantes sencillas (Fig. 9). Esto indica que la eliminación de ambos genes es perjudicial para la supervivencia del organismo.

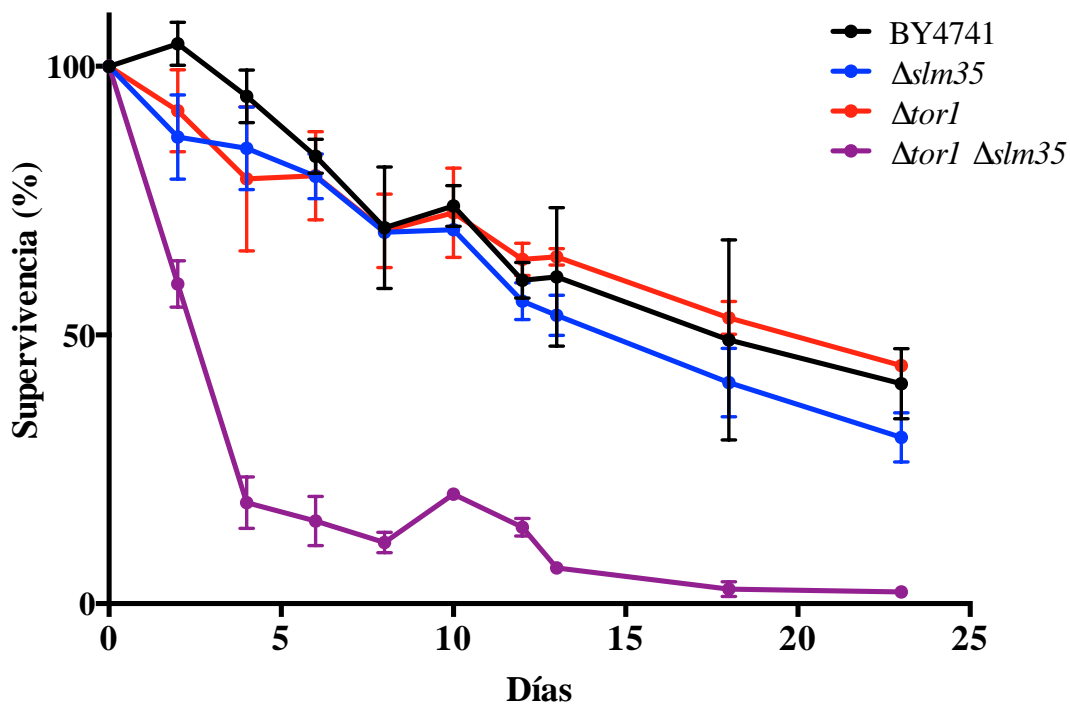


Figura 9. La delección simultánea de *SLM35* y *TOR1* disminuye la esperanza de vida. Las cepas se crecieron en medio SCD 2% hasta la fase estacionaria de crecimiento y a partir de este punto se midió la supervivencia relativa de los cultivos envejecidos. Los puntos representan el promedio de tres réplicas biológicas independientes y las barras representan la desviación estándar.

7.5 Regulación del sistema antioxidante

La sensibilidad frente a estrés térmico y el la disminución de la CLS de la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ podría deberse a un problema de regulación de la maquinaria de desintoxicación celular. En particular, la superóxido dismutasa mitocondrial Sod2 es requerida para la tolerancia contra el insulto oxidativo inducido por el estrés térmico (Sugiyama *et al.*, 2000). Por esto se decidió evaluar los niveles basales de la proteína Sod2 en las cepas mutantes $\Delta slm35$, $\Delta tor1$ y $\Delta tor1 \Delta slm35$ mediante inmunorréplica tipo Western. Estas cepas se transformaron con el plásmido pSOD2-2HA (Ponce Rojas, 2016), el cual contiene a Sod2 fusionada con dos etiquetas de hemaglutinina (HA) bajo el promotor endógeno de *SOD2*. Las cepas fueron analizadas en fase logarítmica y fase estacionaria de crecimiento en abundancia de glucosa (Fig. 10A) y en condiciones de RC (Fig. 10B). En la Figura 10A se puede observar una disminución en el nivel basal de Sod2 en la fase logarítmica en comparación con la cepa silvestre y las mutantes sencillas. Sin embargo, en la

fase estacionaria los niveles basales de Sod2 son similares a los de la cepa silvestre y la mutante sencilla $\Delta slm35$. En condiciones de RC no se observa un cambio en el nivel basal de Sod2 en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ durante la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento (Fig. 10B).

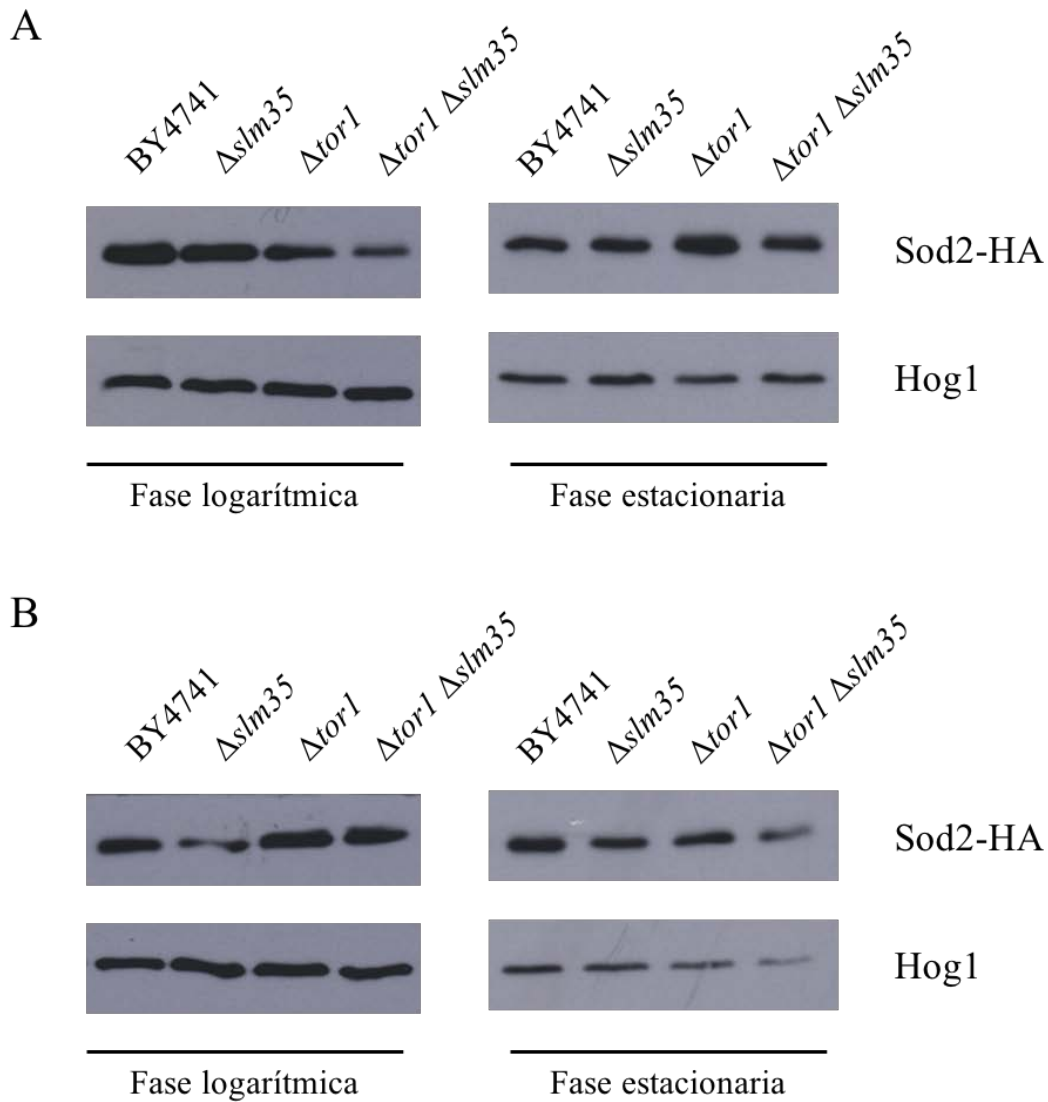


Figura 10. La delección de *SLM35* no modifica los niveles basales de Sod2. Se midieron los niveles basales de Sod2 de cultivos crecidos en medio SCD-Ura con 2% (A) y 0.5% (B) de glucosa. Las células fueron analizadas en fase logarítmica (14-16 h) y fase estacionaria (3 días) de crecimiento mediante extracción de proteína total e inmunorréplica tipo Western. Las membranas se incubaron con los anticuerpos α -HA y α -Hog1; Hog1 fue utilizado como control de carga.

7.6 Efecto de *Slm35* sobre la morfología mitocondrial

Mediante la fusión, fisión y degradación (mitofagia), las mitocondrias logran adaptarse morfológica y funcionalmente a diferentes estados metabólicos y demandas energéticas (Liesa & Shirihai, 2013). Estos procesos se comprometen durante el envejecimiento, y la incapacidad de modular la morfología mitocondrial causa un aumento en la disfunción de este organelo. La desregulación de la maquinaria de la dinámica mitocondrial en *S. cerevisiae* disminuye la esperanza de vida replicativa y la mitofagia (Bernhardt *et al.*, 2015), lo que indica que la esperanza de vida podría estar correlacionada con la morfología mitocondrial.

Evaluamos la morfología mitocondrial de la cepa silvestre BY4741 y las mutantes sencillas $\Delta slm35$, $\Delta tor1$, $\Delta ras2$ y $\Delta sch9$, y en las dobles mutantes de estos genes en conjunto con *SLM35* (Fig. 11A). Se transformaron a las distintas cepas con el plásmido pVT100U-mtGFP que contiene a la proteína verde fluorescente (GFP) con una secuencia de localización mitocondrial (Westermann & Neupert, 2000), lo que permite visualizar a las mitocondrias mediante microscopía confocal. El análisis de las cepas en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento reveló cuatro morfotipos mitocondriales distintos: (i) morfotipo filamentososo con una red mitocondrial ramificada, (ii) morfotipo lineal con una mitocondria alargada sin ramificar, (iii) morfotipo intermedio entre una red mitocondrial y mitocondrias fragmentadas, y (iv) morfotipo fragmentado en el que las mitocondrias se ven como focos discretos (Fig. 11B). Se cuantificaron manualmente los morfotipos individuales en las poblaciones de las cepas analizadas (Fig. 11C-D).

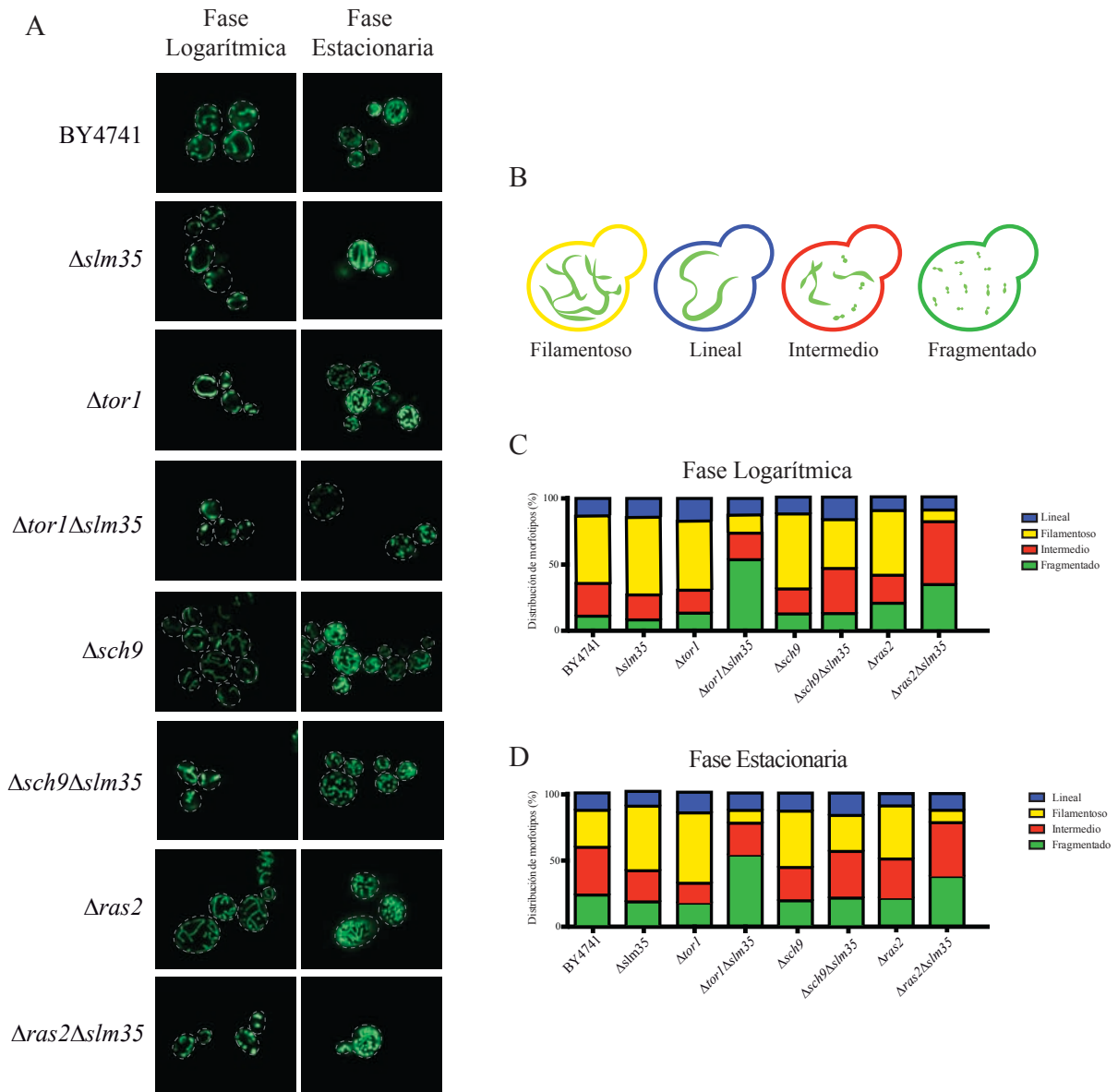


Figura 11. Slm35 afecta la morfología mitocondrial. Las cepas indicadas fueron transformadas con el plásmido pVT100U-mtGFP, el cual codifica a la proteína GFP con localización mitocondrial (ver Materiales y Métodos). A) Imágenes representativas de la morfología mitocondrial de cepas. B) Diagrama representativo de cada morfotipo identificado. C) Cuantificación de los morfotipos en las distintas mutantes en fase logarítmica (14-16 horas) y estacionaria de crecimiento (3 días).

En la fase logarítmica de crecimiento se observó que las mutantes sencillas $\Delta slm35$, $\Delta tor1$, $\Delta ras2$ y $\Delta sch9$ presentaron una distribución de morfotipos similar a la cepa silvestre BY4741 (Tabla V). Como se ha reportado en investigaciones previas (Wong *et al.*, 2000; Scheckhuber *et al.*, 2006), la gran mayoría de las mitocondrias de la cepa silvestre

presentaron un morfotipo filamentosos (51%). Este morfotipo también fue el predominante en $\Delta slm35$ (59%), $\Delta tor1$ (52%), $\Delta ras2$ (49%) y $\Delta sch9$ (57%). En contraste, las dobles mutantes presentaron una mayor fragmentación de la red mitocondrial, siendo las dobles mutantes $\Delta tor1 \Delta slm35$ (54%) y $\Delta ras2 \Delta slm35$ (34%) las que obtuvieron una fragmentación más pronunciada.

La evaluación en la fase estacionaria de crecimiento reveló que las mutantes sencillas $\Delta tor1$, $\Delta slm35$, $\Delta sch9$ y $\Delta ras2$ presentaron una mayor conservación de la red mitocondrial filamentosos (53%, 49%, 42% y 40%, respectivamente) en comparación con la cepa silvestre BY4741 (28%). De manera similar, las dobles mutantes $\Delta tor1 \Delta slm35$ y $\Delta ras2 \Delta slm35$ mantuvieron una distribución similar de los morfotipos en la fase estacionaria en comparación con la fase logarítmica de crecimiento.

Tabla V. Porcentaje de los distintos morfotipos en la cepa silvestre y las distintas mutantes en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

Cepa	Fase Logarítmica				Fase Estacionaria			
	L	Fi	I	Fr	L	Fi	I	Fr
BY4741	12	52	25	11	13	28	36	23
$\Delta slm35$	14	59	19	8	11	49	23	17
$\Delta tor1$	18	52	17	13	15	53	15	17
$\Delta tor1 \Delta slm35$	13	13	20	54	13	10	24	56
$\Delta sch9$	13	57	19	11	14	43	25	18
$\Delta sch9 \Delta slm35$	17	37	34	12	17	27	35	21
$\Delta ras2$	10	49	21	20	9	40	30	21
$\Delta ras2 \Delta slm35$	10	9	47	34	13	9	41	37

Morfotipo Lineal (L), Filamentosos (Fi), Intermedio (I) y Fragmentado (Fr)

7.7 Relevancia de Slm35 en la inducción de la autofagia

Distintas vías de señalización regulan la autofagia en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, incluyendo las vías TOR y Ras/cAMP/PKA, las cuales convergen de manera independiente en el control de la actividad de los componentes que inician la formación del autofagosoma (Stephan *et al.*, 2009). Además, la autofagia es requerida para la extensión de la esperanza de vida cronológica mediada por la inhibición de Tor1 (Alvers *et al.*, 2009).

Decidimos evaluar el papel de Slm35 en la autofagia inducida por restricci3n de nitr3geno y su papel en la regulaci3n de este proceso por las v3as de TOR/RAS. Para esto, monitoreamos la autofagia en la cepa silvestre BY4741, en las mutantes sencillas $\Delta slm35$, $\Delta tor1$ y $\Delta ras2$, y en las dobles mutantes $\Delta tor1 \Delta slm35$ y $\Delta ras2 \Delta slm35$ utilizando el reportero GFP-ATG8 (Suzuki *et al.*, 2001). GFP-Atg8 se asocia a la membrana del autofagosoma y el dominio Atg8 se degrada en la vacuola liberando al motivo GFP, el cual es resistente a la prote3lisis. El incremento de GFP libre puede ser detectado mediante inmunorr3plica tipo Western y correlacionado con la velocidad de inducci3n de la autofagia (Nair *et al.*, 2011).

En la Figura 12 se puede observar c3mo a los 0 d3as de inducci3n de la autofagia hay se3al de GFP libre en las mutantes $\Delta tor1$, $\Delta ras2$ y $\Delta ras2 \Delta slm35$. Tor1 y Ras2 son reguladores negativos de la autofagia (Noda & Ohsumi, 1998; Stephan *et al.*, 2009), por lo que la eliminaci3n de estos factores induce la autofagia inclusive en condiciones de disponibilidad de nutrientes. En contraste, la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ tuvo una disminuci3n en el flujo de la autofagia, inclusive al tercer d3a luego de la inducci3n en comparaci3n con las dem3s cepas. La inducci3n de la autofagia en la doble mutante $\Delta ras2 \Delta slm35$ no se vio afectada, ya que el flujo de autofagia observado en esta mutante es similar al de la mutante sencilla $\Delta ras2$. Estos datos indican que Slm35 est3 correlacionada en la regulaci3n de la autofagia con Tor1.

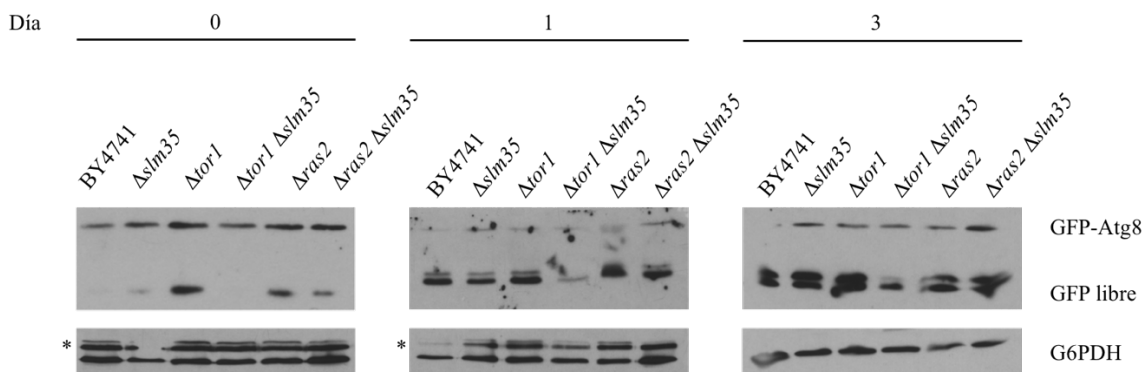


Figura 12. Slm35 contribuye a la regulaci3n de la autofagia dependiente de Tor1. Las cepas transformadas con el pl3smido GFP-ATG8 fueron crecidas hasta la fase logar3mica (5 h) y luego se transfirieron al medio de inducci3n por restricci3n de nitr3geno SD(-N) 2%. Las c3lulas fueron analizadas en los tiempos indicados mediante extracci3n de prote3na total e inmunorr3plica tipo Western. Las membranas se incubaron con los anticuerpos α -GFP y α -G6PDH; G6PDH fue utilizado como control de carga.

8. Discusión

Las mitocondrias juegan un rol central en la supervivencia del organismo y están involucradas en una gran variedad de procesos esenciales incluyendo la generación de ATP por fosforilación oxidativa, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la biosíntesis de centros Fe-S y la β -oxidación de los ácidos grasos. Además, son reguladores clave en la muerte celular programada y envejecimiento mediante múltiples vías de señalización. Debido a que son los principales productores de ROS, se ha estudiado con gran profundidad el papel de las mitocondrias durante la regulación de la esperanza de vida de los organismos (Bratic & Larsson, 2013).

En este trabajo reportamos la primera caracterización funcional de la proteína mitocondrial Slm35 en *S. cerevisiae*. A partir del análisis del promotor de *SLM35* se identificaron sitios conservados de regulación transcripcional que sugieren una posible función durante procesos de respuesta a estrés y la entrada a la fase post-diáuxica de crecimiento. Estos datos nos llevaron a encontrar que la delección de *SLM35* aumenta la resistencia a estrés térmico (Fig. 4) y, en un trabajo paralelo, una resistencia a estrés oxidativo utilizando H_2O_2 (Aguilar López, 2016).

El promotor de *SLM35* sugiere que podría estar regulado por factores de transcripción de la vía de TOR y/o Ras/cAMP/PKA, por lo que decidimos estudiar si existía una relación funcional entre *SLM35* y estas vías de detección de nutrientes. Nuestros datos indican que *SLM35* presenta interacción genética negativa con *TOR1* en condiciones de estrés, ya que la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ es incapaz de contender contra el estrés térmico (Fig. 8). Adicionalmente, esta doble mutante presenta una reducción en la CLS en comparación con las mutantes sencillas y la cepa silvestre (Fig. 9). Aún no está totalmente claro si esta disminución en la CLS se debe a un envejecimiento prematuro o es causado por un aumento en la inducción de la apoptosis. McVey *et al.* (2001) reportaron que algunas mutaciones que disminuyen la esperanza de vida lo hacen mediante un aumento en la tasa de envejecimiento y no debido a un incremento en la inducción de la apoptosis mediada por caspasas. Sin embargo, aun queda estudiar cual es la razón por la que disminuye la CLS en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$.

La expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial Sod2 está regulada negativamente por la cinasa Sch9. Además, Sod2 es requerida para la extensión de la CLS

de una mutante $\Delta sch9$ (Fabrizio *et al.*, 2003). Sin embargo, la extensión en la CLS mediada por la inhibición de *TOR1* no requiere a Sod2 (Bonawitz *et al.*, 2007). En la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ hubo una disminución en el nivel basal de Sod2 durante la fase logarítmica de crecimiento en condiciones de disponibilidad de glucosa (Fig. 10A), aunque en condiciones el nivel basal de esta proteína se restauró en la fase estacionaria. Sin embargo, no se observó una disminución de los niveles basales de Sod2 en condiciones de RC en ninguna de las fases de crecimiento analizadas (Fig. 10B). Por el momento no podemos relacionar la disminución en la resistencia a estrés térmico con una disminución en la cantidad de esta enzima antioxidante. No se descarta que se pueda estar regulando la actividad de Sod2 mediante fosforilación, como demostraron Candas & Li (2014) por alguna cinasa mitocondrial. Adicionalmente, otras enzimas antioxidantes podrían estar participando como mecanismo como compensatorio. Aguilar López (2016) demostró que la actividad de la catalasa citosólica Ctt1 se encuentra disminuida en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ durante la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

Las mitocondrias son organelos dinámicos que modifican su morfología de acuerdo con las demandas energéticas de la célula (Liesa & Shirihai, 2013). Este proceso se compromete durante el envejecimiento, y la incapacidad de modular la morfología mitocondrial causa un aumento en la disfunción de este organelo. En el nematodo *C. elegans* se demostró que hay un aumento en la fragmentación de la red mitocondrial en las células musculares a medida que el animal envejece (Regmi *et al.*, 2014). En *Podospora anserina* se ha observado un aumento en el transcrito de *DNMI*, implicado en la fisión mitocondrial, y una disminución de la red mitocondrial durante el envejecimiento del hongo filamentoso (Scheckhuber *et al.*, 2006). La eliminación de *DNMI* en *P. anserina* y *S. cerevisiae* incrementa la resistencia ante la inducción de apoptosis y aumenta la esperanza de vida cronológica en ambos organismos (Scheckhuber *et al.*, 2006). Además, la desregulación de la maquinaria de la dinámica mitocondrial en *S. cerevisiae* disminuye la esperanza de vida replicativa y la mitofagia (Bernhardt *et al.*, 2015). En mutantes de levadura longevas que carecen del gen *TOR1* se ha observado una reducción en la fragmentación mitocondrial (Aung-Htut *et al.*, 2013).

Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Aung-Htut *et al.* (2013), en donde se observó un aumento en la fragmentación de la red mitocondrial durante el envejecimiento en

S. cerevisiae. En nuestro estudio encontramos que la delección de *SLM35* conserva la morfología de la red mitocondrial en la fase estacionaria de crecimiento en comparación con la cepa silvestre (Fig. 11, Tabla V). Además observamos que la eliminación simultánea de *SLM35* y *TOR1* compromete la morfología mitocondrial. La alta fragmentación de la red mitocondrial en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ podría ser una consecuencia de su corta CLS como se ha reportado anteriormente (Regmi *et al.*, 2014). Sería importante evaluar cómo se encuentran las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial para conocer si Slm35 está participando de manera directa o indirecta en este proceso.

En un estudio en nuestro laboratorio se encontró que *SLM35* presenta interacción genética negativa con los genes *ATG1*, *ATG4*, *ATG6*, *ATG17* y *ATG21* en condiciones de estrés térmico (Aguilar López, 2016). De éstas se ha descrito que Atg1 y Atg17 transducen la señal de autofagia regulada por TORC1 (Inoue & Klionsky, 2010) por lo que decidimos evaluar el papel de Slm35 durante la autofagia. En la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ se encontró una disminución en la inducción de la autofagia, lo que indica que Slm35 es requerida para que se active la señal de autofagia cuando se elimina el gen *TOR1*. La función de Slm35 durante este proceso parece ser complementaria con la vía de TOR1, ya que la eliminación de *SLM35* en una mutante $\Delta ras2$ no afecta la inducción de la autofagia en esta cepa. Este defecto explicaría por qué el envejecimiento prematuro y la sensibilidad al estrés de la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$, ya que se ha reportado que la autofagia es importante para que se lleve a cabo la extensión en la CLS mediada por la inhibición de TORC1 (Hansen *et al.*, 2008). Además, se ha visto que durante el envejecimiento hay una disminución en la actividad de la autofagia y una reducción en la expresión de los genes *ATG* (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

Resultados en nuestro grupo de trabajo muestran que la eliminación de *SLM35* aumenta la tasa de inducción de la mitofagia, por lo que Slm35 participa como un regulador negativo en este proceso de degradación selectiva de las mitocondrias (Aguilar López, 2016). Este aumento en la mitofagia podría explicar el aumento en la resistencia a estrés térmico y oxidativo cuando se elimina el gen *SLM35* (Knuppertz & Osiewacz, 2016). Hasta el momento, sólo se han reportado dos proteínas que participan específicamente en la mitofagia, Atg32 y Atg33, por lo que sería interesante evaluar la posible relación entre Slm35 y estas proteínas.

La función específica de SIm35 permanece como una incógnita. Una posible función, que se relaciona con las características estructurales predichas para esta proteína, podría ser la regulación en la composición lipídica de las membranas mitocondriales. Se ha observado que la fosfatidiletanolamina regula positivamente la autofagia (Rockenfeller *et al.*, 2015). El principal productor de este fosfolípido es la mitocondria, por lo que SIm35 podría estar regulando negativamente su biosíntesis. También podría estar relacionada mediando la respuesta de apoptosis al translocar lípidos específicos de una de las membranas mitocondriales a la otra tal y como sucede con su homólogo mitocondrial hPLSCR3 en humanos (Liu *et al.*, 2003).

9. Conclusiones

- La delección de *SLM35* aumenta la resistencia a estrés térmico durante la fase estacionaria de crecimiento.
- *SLM35* presenta una interacción sintético letal con *TOR1* en condiciones de estrés térmico.
- La eliminación simultánea de *SLM35* y *TOR1* reduce la CLS en un 86%.
- El incremento en la sensibilidad de la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ no se debe a diferencias en los niveles basales de la superóxido dismutasa mitocondrial Sod2.
- Una cepa que carece de *SLM35* conserva una red mitocondrial ramificada e interconectada durante la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ la red mitocondrial se encuentra altamente fragmentada.
- La inducción de la autofagia se ve comprometida en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$.
- El aumento en la fragmentación de la red mitocondrial en la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ es independiente del proceso de autofagia.

10. Perspectivas

- Caracterizar bioquímica y funcionalmente la actividad de escramblasa de Slm35 mediante reconstitución en proteoliposomas.
- Evaluar la expresión del transcrito de *SLM35* durante distintos tiempos del envejecimiento cronológico.
- Determinar si la reducción en la CLS de la doble mutante $\Delta tor1 \Delta slm35$ se debe a un envejecimiento prematuro o se debe a un aumento en la inducción de la apoptosis.
- Cuantificar la producción de ROS en las mutantes $\Delta slm35$, $\Delta tor1$ y $\Delta tor1 \Delta slm35$.
- Evaluar si Slm35 participa en conjunto con Atg32 y Atg33 durante la inducción de la mitofagia.

11. Anexos

11.1 Medios de cultivo

YPD

	500 mL	1,000 mL
Extracto de lavadura (1%)	5 g	10 g
Peptona (2%)	10 g	20 g
Glucosa (2%)	25 mL de glucosa al 40%	50 mL de glucosa al 40%
Agar (2%)*	10 g	20 g

Ajustar pH a 6 con HCl.

*Para medio sólido.

YPG

	500 mL	1,000 mL
Extracto de lavadura (1%)	5 g	10 g
Peptona (2%)	10 g	20 g
Glicerol (2%)	25 mL de glicerol al 40%	50 mL de glicerol al 40%
Agar (2%)*	10 g	20 g

Ajustar pH a 6 con HCl.

*Para medio sólido.

LB

	500 mL	1,000 mL
Extracto de levadura (0.5%)	2.5 g	5 g
Triptona (1%)	5 g	10 g
NaCl (1%)	5 g	10 g
Agar (2%)*	10 g	20 g

*Para medio sólido

Medio Sintético Completo - SC

	500 mL	1,000 mL
YNB (0.17%)	0.85 g	1.7 g
(NH ₄)SO ₄ (0.5%)	2.5 g	5 g
Dropout mix	1 g	2 g
Agar (2%)*	10 g	20 g

Para medio SCD, añadir glucosa a la concentración deseada. Para medio SCGal, añadir galactosa a la concentración deseada. El medio SC-Ura incluye el Dropout mix sin Uracilo. *Para medio sólido

Medio de Inducción de Autofagia - SD(-N)

	500 mL	1,000 mL
YNB (0.17%)	0.85 g	1.7 g
Glucosa (2%)	25 mL de glucosa al 40%	50 mL de glucosa al 40%

Dropout mix

Adenina	0.2 g	Leucina	4 g
Alanina	0.8 g	Lisina	0.8 g
Arginina	0.8 g	Metionina	0.8 g
Aspargina	0.8 g	Fenilalanina	0.8 g
Ácido para-aminobenzoico	0.8 g	Prolina	0.8 g
Ácido aspártico	0.8 g	Serina	0.8 g
Ácido glutámico	0.8 g	Treonina	0.8 g
Cisteina	0.8 g	Tirosina	0.8 g
Glicina	0.8 g	Uracilo	0.8 g
Glutamina	0.8 g	Valina	0.8 g
Histidina	0.8 g	Triptófano	0.8 g
Isoleucina	0.8 g	Inositol	0.8 g

El peso total es de 21.8 g. Por cada 1,000 mL de medio SC se requieren 2 g de Dropout mix.

11.2 PCR

Reactivo	Concentración
Oligonucleótido	20 pmol
DNA molde	100 ng
MgCl ₂	1.5 mM
TaqPol	2.5 U
dNTPs	200 µM

12. Literatura Citada

- Aguilar López, J.L. 2016. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Alvers, A.L.; Wood, M.S.; Hu, D.; Kaywell, A.C.; Dunn, W.A., Jr.; & Aris, J.P. 2009. Autophagy is required for extensión of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy*, **5**(6):847-9.
- Amberg, D.; Burke, D. & Strathern, J.N. 2005. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashrafi, K.; Sinclair, D.; Gordon, J.I.; & Guarente, L. 1999. Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(16):9100–5.
- Aung-Htut, M.T.; Lam, Y.T.; Lim, Y.-L.; Rinnerthaler, M.; Gelling, C.L.; Yang, H.; Breitenbach, M. & Dawes, I.W. 2013. Maintenance of mitochondrial morphology by autophagy and its role in high glucose effects on chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev*, **2013**:1-13.
- Bandy, B. & Davidson, A.J. 1990. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med*, **8**(6):523-39.
- Beck, T. & Hall, M.N. 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, **402**(6762):689-92.
- Bernhardt, D.; Müller, M.; Reichert, A.S. & Osiewacz, H.D. 2015. Simultaneous impairment of mitochondrial fission and fusión reduces mitophagy and shortens replicative lifespan. *Sci Rep*, **5**:7885.
- Bohovyeh, I.; Fernandez, M.R.; Rahn, J.J.; Stackley, K.D.; Bestman, J.E.; Anandhan, A.; Franco, R.; Claypool, S.M.; Lewis, R.E.; Chan, S.S. & Khalimonchuk, O. 2015. Metalloprotease OMA1 fine-tunes mitochondrial bioenergetic function and respiratory supercomplex stability. *Sci Rep*, **5**:13989.
- Bonawitz, N.D.; Chatenay-Lapointe, M.; Pan, Y. & Shadel, G.S. 2007. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab*, **5**(4):265–77.
- Boorstein, W.R. & Craig, E.A. 1990. Regulation of a yeast *HSP70* gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *EMBO J*, **9**(8):2543-53.
- Brachmann, C.; Davies, A.; Cost, G.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P. & Boeke, J. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**(2):115-32.
- Bratic, A. & Larsson, N.-G. 2013. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*, **123**(3):951-7.
- Budovskaya, Y.V.; Stephan, J.S.; Deminoff, S.J. & Herman, P.K. 2005. An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(39):13933-8.
- Cai, Y. & Wei, Y.-H. 2016. Stress resistance and lifespan are increased in *C. elegans* but decreased in *S. cerevisiae* by *mafr-1/maf1* deletion. *Oncotarget*, **7**(10):10812-26.
- Calabrese, E.J. 2013. Hormesis: Toxicological foundations and role in aging research. *Exp Gerontol*, **48**(1):99-102.

- Candas, D. & Li, J.J. 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Signal*, **20**(10):1599-617.
- Chen, H. & Chan, D.C. 2004. Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Biol*, **59**:119-44.
- Costanzo, M.; Baryshnikova, A.; Bellay, J.; Kim, Y.; Spear, E.D.; Sevier, C.S.; Ding, H.; Koh, J.L.; Toufighi, K.; Mostafavi, S.; Prinz, J.; St Onge, R.P.; VanderSluis, B.; Makhnevych, T.; Vizeacoumar, F.J.; Alizadeh, S.; Brost, R.L.; Chen, Y.; Cokol, M.; Deshpande, R.; Li, Z.; Lin, Z.Y.; Liang, W.; Marback, M.; Paw, J.; San Luis, B.J.; Shuteriqi, E.; Tong, A.H.; van Dyk, N.; Wallace, I.M.; Whitney, J.A.; Weirauch, M.T.; Zhong, G.; Zhu, H.; Houry, W.A.; Brudno, M.; Ragibizadeh, S.; Papp, B.; Pal, C.; Roth, F.P.; Giaever, G.; Nislow, C.; Troyanskaya, O.G.; Bussey, H.; Bader, G.D.; Gindras, A.C.; Morris, Q.D.; Kim, P.M.; Kaiser, C.A.; Myers, C.L.; Andrews, B.J. & Boone, C. 2010. The genetic landscape of a cell. *Science*, **327**(5964):425-31.
- De Virgilio, C. & Loewith, R. 2006. The TOR signalling network from yeast to man. *The Int J of Biochem & Cell Biol*, **38**(2006):1476-81.
- Detmer, S.A. & Chan, D.C. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**(11):870-9.
- Dillin, A.; Hsu, A.L.; Arantes-Oliveira, N.; Lehrer-Graiwer, J.; Hsin, H.; Fraser, A.G.; Kamath, R.S.; Ahringer, J. & Kenyon, C. 2002. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science*, **298**(5602):2398-401.
- Durieux, J.; Wolff, S. & Dillin, A. 2011. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*, **144**(1):79-91.
- Fabrizio, P. & Longo, V.D. 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, **2**(2):73-81.
- Fabrizio, P.; Liou, L.-L.; Moy, V.N.; Diaspro, A.; Valentine, J.S.; Gralla, E.B. & Longo, V.D. 2003. *SOD2* functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*, **163**(1):35-46.
- Fabrizio, P.; Pletcher, S.D.; Minois, N.; Vaupel, J.W. & Longo, V.D. 2004. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **557**(1-3):136-42.
- Flattery-O'Brien, J.A.; Grant, C.M. & Dawes, I.W. 1997. Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae SOD2* gene is independent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE- binding elements. *Mol Microbiol*, **23**(2):303-12.
- Garay, E.; Campos, S.E.; Gonzáles de la Cruz, J.; Gaspar, A.P.; Jinich, A.; DeLuna, A. 2014. High-resolution profiling of stationary-phase survival reveals yeast longevity factors and their genetic interactions. *PLoS Genet*, **10**:e1004168.
- Gietz, R.D. & Woods, R.A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/ single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**:87-96.
- Goldstein, A.L. & McCusker, J.H. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **15**(14):1541-53.
- Hansen, M.; Chandra, A.; Mitic, L.L.; Onken, B.; Driscoll, M. & Kenyon, C. 2008. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet*, **4**(2):e24.
- Harman, D. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, **20**(4):145-7.
- Hess, D.C.; Myers, C.L.; Huttenhower, C.; Hibbs, M.A.; Hayes, A.P.; Paw, J.; Clore, J.J.; Mendoza, R.M.; Luis, B.S.; Nislow, C.; Giaever, G.; Costanzo, M.; Troyanskaya,

- O.G. & Caudy, A.A. 2009. Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet*, **5**(3):e1000407.
- Hoppins, S.; Lackner, L. & Nunnari, J. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **76**:751-80.
- Hoppins, S.; Horner, J.; Song, C.; McCaffery, J.M. & Nunnari, J. 2009. Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol*, **184**(4):569-81.
- Huang, K. & Fingar, D.C. 2014. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol*, **36**:79-90.
- Hubbard, E.J.; Jiang, R. & Carlson, M. 1994. Dosage-dependent modulation of glucose repression by MSN3 (STD1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**(3):1972-8.
- Ingerman, E.; Perkins, E.M.; Marino, M.; Mears, J.A.; McCaffery, J.M.; Hinshaw, J.E. & Nunnari, J. 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol*, **170**(7):1021-7.
- Inoue, Y. & Klionsky, D.J. 2010. Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin Cell Dev Biol*, **21**(7):664-70.
- Juhasz, G. & Neufeld, T.P. 2006. Autophagy: A forty-year Search for a missing membrane source. *PLoS Biol*, **4**(2):e36.
- Kamada, Y.; Funakoshi, T.; Shintani, T.; Nagano, K.; Ohsumi, M. & Ohsumi, Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, **150**(6):1507-13.
- Kaser, M.; Kambacheld, M.; Kisters-Woike, B. & Langer, T. 2003. Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem*, **278**(47):46414-23.
- Kenyon, C.J. 2010. The genetics of ageing. *Nature*, **464**(7288):504-12.
- Knuppertz, L. & Osiewacz, H.D. 2016. Orchestrating the network of molecular pathways affecting aging: Role of nonselective autophagy and mitophagy. *Mech Ageing Dev*, **153**:30-40.
- Koshiha, T.; Detmer, S.A.; Kaiser, J.T.; Chen, H.; McCaffery, J.M. & Chan, D.C. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, **305**(5685):858-62.
- Kuret, J.; Johnson, K.E.; Nicolette, C. & Zoller, M.J. 1988. Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cAMP-dependent protein kinase. Isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem*, **263**(19):9149-54.
- Lai, C.C.; Boguski, M.; Broek, D. & Powers, S. 1993. Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins. *Mol Cell Biol*, **13**(3):1345-52.
- Lhermusier, T.; Chap, H. & Payrastre, B. 2011. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost*, **9**(10):1883-91.
- Li, H.; Tsang, C.K.; Watkins, M.; Bertram, P.G. & Zheng, X.F. 2006. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature*, **442**(7106):1058-61.
- Liao, X.H.; Majithia, A.; Huang, X. & Kimmel, A.R. 2008. Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino Acids*, **35**(4):761-70.

- Liesa, M. & Shirihai, O.S. 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, **17**(4):491-506.
- Liu, Y.; Fiskum, G. & Schubert, D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, **80**(5):780-7.
- Liu, J.; Dai, Q.; Chen, J.; Durrant, D.; Freeman, A.; Liu, T.; Grossman, D. & Lee, R.M. 2003. Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Mol Cancer Res*, **1**(12):892-902.
- Loewith, R.; Jacinto, E.; Wullschleger, S.; Lorberg, A.; Crespo, J.L.; Bonenfant, D.; Oppliger, W.; Jenoe, P. & Hall, M.N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, **10**(3):457-68.
- Lopez-Otin, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M. & Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, **153**(6):1194-217.
- Macisaac, K.D.; Wang, T.; Gordon, B.D.; Gifford, D.K.; Stormo, G.D. & Fraenkel, E. 2006. An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics*, **7**:113.
- Marchler, G.; Schüller, C.; Adam, G. & Ruis, H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J*, **12**(5):1997-2003.
- Martínez-Pastor, M.T.; Marchler, G.; Schüller, C.; Marchler-Bauer, A.; Ruis, H. & 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**(9):2227-35.
- McVey, M.; Kaeberlein, M.; Tissenbaum, H.A. & Guarente, L. 2001. The short life span of *Saccharomyces cerevisiae* *sgs1* and *srs2* mutants is a composite of normal aging process and mitotic arrest due to defective recombination. *Genetics*, **157**(4):1531-42.
- Medvedik, O.; Lamming, D.W.; Kim, K.D. & Sinclair, D.A. 2007. *MSN2* and *MSN4* link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol*, **5**(10):e261.
- Mendelsohn, A.R. & Larrick, J.W. 2013. Trade-offs between anti-aging dietary supplementation and exercise. *Rejuvenation Res*, **16**(5):419-26.
- Miinalainen, I.J.; Chen, Z.J. Torkko, J.M.; Pirila, P.L.; Sormunen, R.T.; Bergmann, U.; Qin, Y.M. & Hiltunen, J.K. 2003. Characterization of 2-enoyl thioester reductase from mammals. An ortholog of YBR026p/MRF1'p of the yeast mitochondrial fatty acid synthesis type II. *J Biol Chem*, **278**(22):20154-61.
- Miller 3rd, E.R.; Pastor-Barriuso, R.; Dalal, D.; Riemersma, R.A.; Appel, L.J. & Guallar, E. 2005. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*, **142**(1):37-46.
- Mishra, P. & Chan, D.C. 2015. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**(10):634-46.
- Morano, K.A.; Grant, C.M. & Moye-Rowley, W.S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **190**(4):1157-95.
- Mortimer, R.K. & Johnston, J.R. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature*, **183**(4677):1751-2.
- Murakami, C. & Kaeberlein, M. 2009. Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *J Vis Exp*, (27):1156.

- Nair, U.; Thumm, M.; Klionsky, D.J. & Krick, R. 2011. GFP-Atg8 protease protection as a tool to monitor autophagosome biogenesis. *Autophagy*, **7**(12):1546-50.
- Noda, T. & Ohsumi, Y. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, **273**(7):3963-6.
- Nunnari, J.; Marshal, W.F.; Straight, A.; Murray, A.; Sedat, J.W. & Walter, P. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*, **8**(7):1233-42.
- Ocampo, A.; Liu, J.; Schroeder, E.A.; Shadel, G.S. & Barrientos, A. 2012. Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extensión by caloric restriction. *Cell Metab*, **16**(1):55-67.
- Oh, S.-I.; Park, J.-K. & Park, S.-K. 2015. Lifespan extensión and increased resistance to environmental stressors by N-Acetyl-L-Cysteine in *Caenorhabditis elegans*. *Clinics (Sao Paulo)*, **70**(5):380-6.
- Okamoto, K. & Shaw, J.M. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **39**:503-36.
- Pagac, M.; Vazquez, H.M.; Bochud, A.; Roubaty, C.; Knöpfli, C.; Vionnet, C. & Conzelmann, A. 2012. Topology of the microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase Gpt2p/Gat1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Micro*, **86**(5):1156-66.
- Pan, Y.; Schroeder, E.A.; Ocampo, A.; Barrientos, A. & Shadel, G.S. 2011. Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab*, **13**(6):668-78.
- Partridge, L.; Thornton, J. & Bates, G. 2011. The new science of ageing. *Phil Trans R Soc*, **366**(1561):6-8.
- Pedruzzi, I.; Bürckert, N.; Egger, P. & De Virgilio, C. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J*, **19**(11):2569-79.
- Pedruzzi, I.; Dubouloz, F.; Cameroni, E.; Wanke, V.; Roosen, J.; Winderickx, J. & De Virgilio C. 2003. TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell*, **12**(6):1607-13.
- Piper, P.W. 2006. Long-lived yeast as a model for ageing research. *Yeast*, **23**(3):215-26.
- Ponce Rojas, J.C. 2016. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Powers III, R.W.; Kaeberlein, M.; Caldwell, S.D.; Kennedy, B.K. & Fields, S. 2006. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*, **20**(2):174-84.
- Reinders, J.; Zahedi, R.P.; Pfanner, N.; Meisinger, C. & Sickmann, A. 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res*, **5**(7):1543-54.
- Reggiori, F.; Shintani, T.; Nair, U. & Klionsky, D.J. 2005. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*, **1**(2):101-9.
- Regmi, S.G.; Rolland, S.G. & Conradt, B. 2014. Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging (Albany NY)*, **6**(2):118-30.
- Rockenfeller, P.; Koska, M.; Pietrocola, F.; Minois, N.; Knittelfelder, O.; Sica, V.; Franz, J.; Carmona-Gutierrez, D.; Kroemer, G. & Madeo, F. 2015. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death Differ*, **22**(3):499-508.

- Rohde, J.R.; Bastidas, R.; Puria, R. & Cardenas, M.E. 2008. Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, **11**(2):153–60.
- Ruis, H. & Schüller, C. 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessays*, **17**(11):959-65.
- Sahu, S.K.; Gummadi, S.N.; Manoj, N. & Aradhyam, G. 2007. Phospholipid scramblases: An overview. *Arch Biochem Biophys*, **462**(1):103-14.
- Scheckhuber, C.Q.; Erjavec, N.; Tinazli, A.; Hamann, A.; Nyström, T. & Osiewacz, H.D. 2006. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol*, **9**(1):99-105.
- Schiavi, A. & Ventura, N. 2014. The interplay between mitochondrial and autophagy and its role in the aging process. *Exp Gerontol*, **56**:147-53.
- Schreiber, S.L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*, **251**(4991):283-7.
- Sesaki, H. & Jensen, R.E. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol*, **147**(4):699-706.
- Sesaki, H. & Jensen, R.E. 2004. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem*, **279**(27):28298-303.
- Stephan, J.S.; Yeh, Y.Y.; Ramachandran, V.; Deminoff, S.J. & Herman, P.K. 2009. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**(40):17049-54.
- Sturgill, T.W.; Cohen, A.; Diefenbacher, M.; Trautwein, M.; Martin, D.E. & Hall, M.N. 2008. TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. *Eukaryot Cell*, **7**(10):1819-30.
- Sugiyama, K.; Kawamura, A.; Izawa, S. & Inoue, Y. 2000. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, **352**(Pt 1):71-8.
- Suzuki, K.; Kirisako, T.; Kamada, Y.; Mizushima, N.; Noda, T. & Ohsumi, Y. 2001. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, **20**(21):5971-81.
- Tieu, Q.; Okreglak, V.; Naylor, K. & Nunnari, J. 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol*, **158**(3):445-52.
- Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M. & Wigler, M. 1987. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, **50**(2):277-87.
- Torkko, J.M.; Koivuranta, K.T.; Miinalainen, I.J.; Yagi, A.I.; Schmitz, W.; Kastaniotis, A.J.; Airene, T.T.; Gurvitz, A. & Hiltunen, K.J. 2001. *Candida tropicalis* Etr1p and *Saccharomyces cerevisiae* Ybr026p (Mrf1'p), 2-enoyl thioester reductases essential for mitochondrial respiratory competence. *Mol Cell Biol*, **21**(18):6243-53.
- Urban, J.; Soulard, A.; Huber, A.; Lippman, S.; Mukhopadhyay, D.; Deloche, O.; Wanke, V.; Anrather, D.; Ammerer, G.; Riezman, H.; Broach, J.R.; De Virgilio, C.; Hall, M.N. & Loewith, R. 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **26**(5):663-74.
- Van Raamsdonk, J.M. & Hekimi, S. 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, **5**(2):e1000361.
- Venters, B.J.; Wachi, S.; Mavrich, T.N.; Andersen, B.E.; Jena, P.; Sinnamon, A.J.; Jain, P.; Roller, N.S.; Jiang, C.; Hemeryck-Walsh, C. & Pugh, B.F. 2011. A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell*, **41**(4):480-92.

- Vögtle, F.-N.; Wortelkamp, S.; Zahedi, R.P.; Becker, D.; Leidhold, C.; Gevaert, K.; Kellermann, J.; Voos, W.; Sickmann, A.; Pfanner, N. & Meisinger, C. 2009. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell*, **139**(2):428-39.
- Wach, A.; Brachat, A.; Poehlmann, R. & Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**(13):1793-808.
- Weber, T.; Zemelman, B.V.; McNew, J.A.; Westermann, B.; Gmachl, M.; Parlati, F.; Söllner, T.H. & Rothman, J.E. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, **92**(6):759-72.
- Wei, M.; Fabrizio, P.; Hu, J.; Ge, H.; Cheng, C.; Li, L. & Longo, V.D. 2008. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet*, **4**(1):e13.
- Wei, M.; Fabrizio, P.; Madia, F.; Hu, J.; Ge, H.; Li, L.M. & Longo, V.D. 2009. Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet*, **5**(5):e1000467.
- Werner-Washburne, M.; Braun, E.; Johnston, G.C. & Singer, R.A. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **57**(2):383-401.
- Westermann, B. & Neupert, W. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **16**(15):1421-7.
- Westermann, B. 2008. Molecular Machinery of Mitochondrial Fusion and Fission. *J Biol Chem*, **283**(20):13501-5.
- Wiedmer, T.; Zhou, Q.; Kwok, D.Y. & Sims, P.J. 2000. Identification of three new members of phospholipid scramblase gene family. *Biochim Biophys Acta*, **1467**(1):244-53.
- Winzeler, E.A.; Shoemaker, D.D.; Astromoff, A.; Liang, H.; Anderson, K.; Andre, B.; Bangham, R.; Benito, R.; Boeke, J.D.; Bussey, H.; Chu, A.M.; Connelly, C.; Davis, K.; Dietrich, F.; Dow, S.W.; El Bakkoury, M.; Foury, F.; Friend, S.H.; Gentalen, E.; Giaever, G.; Hegemann, J.H.; Jones, T.; Laub, M.; Liao, H.; Liebundguth, N.; Lockhart, D.J.; Lucau-Danila, A.; Lussier, M.; M'Rabet, N.; Menard, P.; Mittmann, M.; Pai, C.; Rebischung, C.; Revuelta, J.L.; Riles, L.; Roberts, C.J.; Ross-MacDonald, P.; Scherens, B.; Snyder, M.; Sookhai-Mahadeo, S.; Storms, R.K.; Véronneau, S.; Voet, M.; Volckaert, G.; Ward, T.R.; Wysocki, R.; Yen, G.S.; Yu, K.; Zimmermann, K.; Philippsen, P.; Johnston, M. & Davis, R.W. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by deletion and parallel analysis. *Science*, **285**(5429):901-6.
- Wong, E.D.; Wagner, J.A.; Gorsich, S.W.; McCaffery, J.M.; Shaw, J.M. & Nunnari, J. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol*, **151**(2):341-52.
- Yip, C.K.; Murata, K.; Walz, T.; Sabatini, D.M. & Kang, S.A. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell*, **38**(5):768-74.
- Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, **2**(Suppl 2):1542-52.
- Yorimitsu, T.; Zaman, S.; Broach, J.R. & Klionsky, D.J. 2007. Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **18**(10):4180-9.

- Zachowski, A. 1993. Phospholipid in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*, **294**(Pt 1):1-14.
- Zaman, S.; Lippman, S.I.; Schneper, L.; Slonim, N. & Broach, J.R. 2009. Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol Syst Biol*, **5**:245.
- Zhang, Y. & Chan, D.C. 2007. Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**(47):18526-30.
- Zheng, Z. & Zou, J. 2001. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **276**(45):41710-16.