

ESTRÉS OXIDATIVO ENDÓGENO EN LA  
LEVADURA *Schizosaccharomyces pombe*:  
SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL  
ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO Y EN  
LA ACTIVACIÓN DE LA QUINASA Sty1

Alice Zuin

TESI DOCTORAL UPF / 2009

Memòria presentada per a l'obtenció del títol de Doctor per la  
Universitat Pompeu Fabra

Direcció de la tesi: Dra. Elena Hidalgo Hernando  
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (CEXS)  
Grup de Recerca en Estrès Oxidatiu i Cicle Cel·lular









*A mi abuelo Valentino*



*Quiero agradecer por adelantado a todas las personas que han estado a mi lado y han permitido que yo hoy esté donde estoy, con esta tesis por concluir. Han sido años muy duros y largos, y si al final esto se está haciendo realidad es porque he crecido con todos vosotros y soy la persona que soy, en lo bueno y en lo malo.*

*A Rubén, lo mejor que me ha pasado en la vida. Sin ti esta tesis no hubiera sido posible, ni muchas otras cosas.... Gracias por la paciencia que has tenido en estos largos años (sobre todo en los fines de semana), por tus broncas sobre las prioridades (que mucho mucho no he escuchado, pero se que tienes razón), por las discusiones sobre la validez de mis “spots” que tan poco te convencen, sobre tus ideas sobre como obtener una anaerobiosis. Serias un científico muy brillante, y de hecho esta tesis es tuya también. Ahora empieza nuestra nueva vida.*

*Grazie alla mia grande e complicata famiglia.  
A mamma, papá, Richi, Cri, la nonna.  
A voi tutti perché mi avete appoggiato, sempre e comunque, e avete permesso che la distanza non fosse così difficile. Per aver accettato che le visite di 48 ore spesso erano il massimo che potevo darvi e per avermi anche fatto patire un po': nel fondo anche questo serve a crescere.*

*A mi familia adoptiva: Tere y Manel, Sandra, Esther, Pep, Alberto, Gael, Neus, Sandrita, Andrea. Me habéis hecho sentir como en casa apoyándome en todos mis momentos de bajón (que no han sido pocos!) A partir de ahora espero estar un poco más presente de lo que he estado en los últimos meses (Esther, prometo ir a veros a Palma!!!) Por fin podréis dejar de preguntarme “¿cuando se acaba esta tesis?”*

*A Elena. Mil gracias por haber confiado en mí (más de lo que confío yo) y por haberme enseñado tanto. También gracias por aguantar tantas narices rojas, por imponerme la sonrisa que tanto me cuesta a veces y por recordarme cuales son los valores importantes. Si hoy soy un poco más fuerte, en parte es gracias a ti.*

*A José. Lo primero que me sale del alma es: gracias por aguantarme la múltiples hipocondrias! Has resuelto importantes momentos de pánico. También gracias por enseñarme tanto y por explicarme pacientemente tantas y tantas veces como cortan BamHI y SmaI!  
El final de esta tesis se merece un brindis con Samuel Adams!*

*Gracias a todos los compañeros del lab, pasados y presentes. Llevo tantos años que el listado será larguísimo! A Ana, y su risa tan “delicada”, la churri petita, Jordi, Carine, los Posas: habéis marcado una época!. A Alberto, por ser unos de los fanáticos de mi tiramisú y por este video de felicitaciones que nunca, nunca olvidaré. A Mir, la otra fanática del tiramisú, por hacerme descubrir tanta buena música (aunque nunca recuerdo los autores); Blanquita, tan delicada y tan fuerte a la vez, eres un encanto; Isabel y sus “besicos” tan tiernos; la hipercinética Nati y sus numerosas locuras; Mercè y su preciosa ayuda; Tsveti y su pasión flamenca que tanta alegría da al labo; Sarela y sus protocolos tan estrafalarios. En fin gracias a David, Esther y Susanna, las new entries del grupo: prometéis mucho....*

*A todos os debo una disculpa, por haberme aislado siempre un poco. Si a alguien le quedase la duda, no es nada personal: soy así, un poco autista.... Se que me he perdido muchas ocasiones de conoceros mejor y he priorizado otras cosas, pero me llevo recuerdos muy buenos de todos vosotros y espero que tengáis de la vida, científica y no, lo que más deseáis. Muchas gracias por aguantar mis momentos cebolla y mis estreses y, sobre todo, por haber hecho de conejitos de India con mis experimentos culinarios. Es un placer cocinar para vosotros!*

*A Monica, simplemente mi “compi” (dentro y fuera del labo). Gracias por nuestros momentos de risa, por tus clases de full contact (dale nombre!!!), por tu sabiduría, tus rabieta, tu forma de aislarte, tus comidas a solas con el National Geographic que no me hacían sentir la única autista del grupo. Eres la mejor.*

*Un agradecimiento especial lo debo a Isabelita, la mejor estudiantita que se pueda querer. Serás una gran gran científica (siempre que tu lo quieras, claro!). Esto solo acaba de empezar, pero si has podido con la fase estacionaria ya verás como lo demás parecerá ligero!*

*A todos mis amigos, que tan raramente consigo ver y están deseando que sea doctora de una vez. Marcos y Elena, gracias por vuestro apoyo moral, y también técnico, y nuestros fines de semana en Palamós y Cerdanyola que tanto me han permitido desconectar. Lucia, Valentina, Simona, la Chi, las Flores (Rosa, tu si que me entiendes!): gracias por estar a mi lado. Geoff: gracias por las charlas filosóficas sobre el oxígeno y este libro tan guay que me regalaste! Anabel y Michele: gracias por compartir estas cenas riquísimas que han aliviado mis fines de semana.*

*A Marina: gracias por ayudarme a “poner fecha”. Sin nuestras charlas estaría aún en la introducción!*

*Aunque no se enteren, gracias a Triqui, mi segundo y tan precioso despertador, y a Greg, Tysson y Aníbal por tantos momentos alegres y por mantenerme despierta (también cuando no era necesario...) con vuestros ronquidos tan finos!*

*Grazie ai Luf, il Liga, Lorenzo, Carboni, per tanta buona musica che ha riaccesso tanti ricordi e alleviato tanti sabati e domeniche passati a "spotare".*

*A todos los que no he nombrado, no por falta de cariño sino de neuronas, que después de tanta tesis ya están colapsadas.*

*Gracias.*



## **RESUMEN**



En *Schizosaccharomyces pombe*, la ruta de la MAP quinasa Sty1 se activa por peróxido de hidrógeno extracelular para inducir una respuesta celular antioxidante. Sin embargo, también puede activarse por otras condiciones de estrés, como la transición a la fase estacionaria de crecimiento. Nuestro trabajo de tesis se ha centrado en la caracterización de este proceso, y en averiguar cómo las condiciones medioambientales y genéticas modulan los niveles de estrés oxidativo endógeno. Por último, entender cómo estos diferentes factores nutricionales y genéticos regulan el envejecimiento cronológico de la levadura de fisión, y cuál es el papel de Sty1 en dicha regulación, han constituido gran parte de nuestro trabajo de tesis.

In *Schizosaccharomyces pombe*, MAP kinase pathway Sty1 is activated by extracellular hydrogen peroxide to induce an antioxidant cellular response. However, Sty1 can be activated by other stress situations, like transition to stationary growth phase. We focused our thesis work on the characterization of this process and on finding out how environmental and genetic conditions regulate endogenous oxidative stress. Finally, to find out how these different nutritional and genetic factors modulate fission yeast chronological aging, and which is Sty1 function in the mentioned modulation, represented a large part of our work.



## **PRÓLOGO**



Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular durante procesos metabólicos como la respiración, o tras la exposición a ciertos agentes ambientales. Estas ROS pueden inactivar biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA provocando enfermedades o incluso muerte celular. Por esa razón, las células poseen actividades enzimáticas, y no enzimáticas, que se encargan de mantener estos oxidantes en niveles no-tóxicos. Se llama estrés oxidativo a la situación en la cual se produce un incremento en la concentración intracelular de ROS como consecuencia de un aumento en la generación o una disminución en la degradación de las mismas.

*Schizosaccharomyces pombe* es un organismo modelo ideal para el estudio de las respuestas a estrés oxidativo en las células eucariotas, ya que posee sensores específicos a estrés oxidativo, como el factor de transcripción Pap1, y rutas de respuesta global a estrés, como las descritas en las células de mamífero, que son activadas por diferentes tipos de estrés. La ruta principal de respuesta global a estrés en *S. pombe* es la de la MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) Sty1.

Este proyecto de tesis doctoral empezó con el objetivo de averiguar cuál era el papel de la quinasa Sty1 en respuesta a fase estacionaria, y cuáles eran las señales que activaban dicha quinasa en esta condición de estrés. Una vez descartado el incremento endógeno de metilgloxal como posible causa, nos centramos en determinar el papel de diferentes medios de cultivo en el metabolismo oxidativo, analizando la hipótesis de que diferentes coeficientes de respiración podrían generar diferentes niveles de estrés oxidativo endógeno, y que ésta fuera la causa de la activación de Sty1 en fase estacionaria. Averiguamos que, respecto a la condición de abundancia de nutrientes, la restricción calórica es más beneficiosa de cara al envejecimiento cronológico. La escasez de nutrientes permite que las células tengan una tasa de respiración mas elevada, lo que implica un incremento de estrés oxidativo endógeno y la consecuente activación de la ruta de respuesta a estrés Sty1.

Nuestros resultados reafirman la teoría según la cual la restricción calórica favorece el envejecimiento cronológico. Este concepto tiene

muchos seguidores y está respaldado por numerosos estudios realizados con diferentes modelos eucariotas.

Nuestros estudios avalan también la nueva teoría, que está tomando fuerza en la última década, según la cual un incremento controlado de estrés oxidativo endógeno activa mecanismos fisiológicos que son esenciales para un envejecimiento más duradero.

Otro aspecto importante que se desprende de nuestro trabajo es la necesidad de que el incremento de estrés oxidativo endógeno sea un fenómeno controlado: situaciones en las que la producción de ROS es excesiva, o los mecanismos de detoxificación de estas insuficientes, provocan efectos deletéreos sobre las células. Así, realizamos una selección genética para identificar mutantes con elevado nivel de estrés oxidativo endógeno: la caracterización de varios de estos mutantes, con defectos en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, nos demostró que sus elevados niveles de ROS durante el crecimiento exponencial impiden su crecimiento en medios de cultivo que favorecen la respiración más que la fermentación, y además disminuyen la esperanza de vida media de los cultivos.

Finalmente, por primera vez se considera un modelo de envejecimiento cronológico que incluye, a la vez, la ruta de respuesta a estrés Sty1 y las rutas de señalización de nutrientes Pka1 y TOR.

## ÍNDICE



# INTRODUCCIÓN

<b>1.</b>	<b>ESTRÉS AMBIENTAL Y RESPUESTA CELULAR</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Respuesta celular a estrés</b>	<b>1</b>
1.1.1	Mecanismos globales de respuesta a estrés	2
1.1.2	Tipos de estrés y respuestas globales o específicas de cada uno	4
1.1.2.1	<i>Estrés por calor</i>	5
1.1.2.2	<i>Estrés oxidativo</i>	6
1.1.2.3	<i>Estrés por metales pesados</i>	10
1.1.2.4	<i>Estrés osmótico</i>	12
1.1.2.5	<i>Estrés nutricional</i>	14
<b>2</b>	<b>ASPECTOS GENERALES DE RESPUESTAS A ESTRÉS EN <i>Schizosaccharomyces pombe</i></b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Respuesta global</b>	<b>16</b>
2.1.1	Ruta de la MAP quinasa Sty1	17
2.1.2	Ruta de la quinasa Pka1	20
<b>2.2</b>	<b>Respuestas específicas a los diferentes tipos de estrés en <i>S. pombe</i></b>	<b>23</b>
2.2.1	Respuesta a estrés por calor	23
2.2.2	Respuesta a estrés oxidativo	24
2.2.2.1	<i>Pap1</i>	24
2.2.2.2	<i>Tpx1</i>	26
2.2.2.3	<i>Prr1</i>	26
2.2.3	Respuesta a estrés por metales pesados	27
2.2.4	Respuesta a estrés osmótico	29
2.2.5	Respuesta a falta de glucosa	31
2.2.6	Respuesta a falta de nitrógeno	33
2.2.6.1	TOR	34
<b>3</b>	<b>FASE ESTACIONARIA: UN TIPO DE ESTRÉS AMBIENTAL</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Perfil de la curva de crecimiento de cultivos microbianos</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Cambios en respuesta a la entrada en fase estacionaria</b>	<b>38</b>
3.2.1	Fase estacionaria en bacterias: <i>E. coli</i> como modelo	38
3.2.1.1	<i>Mutantes GASP</i>	39
3.2.1.2	<i>Regulación del cambio en la expresión génica</i>	40
3.2.1.3	<i>Perfil de la expresión génica en fase estacionaria</i>	40

3.2.1.4	<i>“Quorum sensing” como señal de fase estacionaria</i>	41
3.2.2	Fase estacionaria en <i>S. cerevisiae</i>	42
3.2.2.1	<i>Perfil de crecimiento de S. cerevisiae</i>	42
3.2.2.2	<i>Rutas que regulan la fase estacionaria en S. cerevisiae</i>	43
3.2.2.3	<i>Regulación de transcripción y traducción</i>	45
3.2.3	Fase estacionaria en <i>S. pombe</i>	45
3.2.3.1	<i>Perfil de crecimiento de S. pombe</i>	46
3.2.3.2	<i>Metabolismo de utilización de los azúcares en S. pombe</i>	46
3.2.3.3	<i>Rutas que regulan la fase estacionaria en S. pombe</i>	48
3.2.3.4	<i>Perfil de la expresión génica en fase estacionaria</i>	50
<b>3.3</b>	<b>Fase estacionaria en <i>S. pombe</i> como modelo de envejecimiento cronológico</b>	<b>51</b>
3.3.1	Envejecimiento replicativo y envejecimiento cronológico	51
3.3.2	Efecto de la escasez de nutrientes sobre el envejecimiento cronológico	51
3.3.2.1	<i>Escasez de nitrógeno</i>	52
3.3.2.2	<i>Escasez de glucosa</i>	52
3.3.3	Acumulación de especies tóxicas derivadas del metabolismo	54
3.3.3.1	<i>ROS</i>	54
3.3.3.2	<i>Metilglioxal</i>	55

## **OBJETIVOS** **59**

## **RESULTADOS Y METODOLOGÍA**

### **1 EFECTOS DEL METILGLIOXAL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS DE RESPUESTA A ESTRÉS EN *S. pombe*** **61**

**1.1 La resistencia frente a tratamiento con metilglioxal y la activación de su ruta de detoxificación requieren la actividad de las rutas de Pap1 y de Sty1** **62**

**1.2 La presencia de metilglioxal extracelular activa la ruta de Pap1** **63**

**1.3 La zona C-CRD de la proteína Pap1 es necesaria y suficiente para su activación frente a estrés por MG** **66**

**1.4 Sty1 es activado por altas dosis de metilglioxal extracelular** **69**

**1.5 Sty1, pero no Pap1, se activa en condición de fase estacionaria** **70**

## **2 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE DEFECTOS MITOCONDRIALES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ENVEJECIMIENTO**

**73**

**2.1 En fase exponencial las células tienen una tasa de consumo de oxígeno distinta dependiendo del medio de cultivo 74**

**2.2 La tasa de consumo de oxígeno es directamente proporcional al nivel de estrés oxidativo endógeno 75**

**2.3 Identificación de mutantes sensibles a elevadas dosis de ROS intracelulares 77**

**2.4 El uso de condiciones anaeróbicas o de antioxidantes mejora los defectos de crecimiento de los mutantes mitocondriales 80**

**2.5 Los mutantes mitocondriales presentan un elevado nivel de estrés oxidativo intrínseco 83**

**2.6 El elevado estrés oxidativo intrínseco de los mutantes mitocondriales afecta a su viabilidad en fase estacionaria 84**

## **3 PAPEL DE LA MAP QUINASA Sty1 EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO**

**87**

**3.1 La actividad quinasa de Sty1 es necesaria para la supervivencia en fase estacionaria 88**

**3.2 *S. pombe* presenta una supervivencia elevada cuando crece en medio mínimo (restricción calórica), pero no en medio rico 89**

**3.3 Sty1 activa la respuesta a estrés por fase estacionaria solamente en condición de restricción calórica 90**

**3.4 La restricción calórica confiere a las células en fase estacionaria una resistencia a estrés Sty1-dependiente 92**

**3.5 Células de *S. pombe* expresando el mutante “sensible a análogo”, Sty1.T97A, presentan defectos de viabilidad en fase estacionaria 94**

**3.6 La inactivación de las rutas de señalización de nutrientes en *S. pombe* induce un aumento de la esperanza de vida en una forma Sty1-dependiente 95**

**3.7 La activación constitutiva de Sty1 mejora el envejecimiento cronológico en medio rico 99**

3.8	La activación de Sty1 en fase estacionaria es debida a la producción de ROS	100
3.9	La condición de fase estacionaria en medio mínimo es reproducible disminuyendo la concentración de glucosa del medio rico	102
4	METODOLOGÍA	105
4.1	Cepas y plásmidos	105
4.2	Técnicas experimentales	108
	<b>DICUSIÓN</b>	<b>118</b>
1	EL METABOLITO METILGLIOXAL ACTIVA LAS RUTAS DE RESPUESTA A ESTRÉS DE Pap1 Y DE Sty1, PERO NO ES EL ENCARGADO DE ACTIVAR A Sty1 EN LA TRANSICIÓN A FASE ESTACIONARIA	119
2	LOS MEDIOS DE CULTIVO DETERMINAN LOS NIVELES BASALES INTRACELULARES DE ROS EN <i>S. pombe</i> EN BASE A SU CAPACIDAD PARA FOMENTAR EL METABOLISMO OXIDATIVO	121
3	¿QUÉ ACTIVIDADES CELULARES REGULAN LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ROS? SELECCIÓN DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES POR DELECIÓN DE <i>S. pombe</i>	123
3.1	Procedimiento de la doble selección para aislar mutantes con estrés oxidativo basal	123
3.2	Defectos en el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial provocan un incremento del estrés oxidativo endógeno	124
4	ESTUDIOS DE ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO EN <i>S. pombe</i>	126
4.1	Efectos medioambientales que modulan el envejecimiento cronológico en la levadura de fisión	126

4.2	La MAP quinasa Sty1 es esencial para promover la viabilidad de cultivos sometidos a restricción calórica	127
4.3	Defectos en la ruta de la quinasa Pka1 inducen viabilidad incluso con exceso de glucosa en forma Sty1-dependiente	129
4.4	¿Cuál es el mecanismo por el que la inactivación de la ruta de TOR/Sck2 induce longevidad en <i>S. pombe</i> ?	130
4.5	Modelo final del papel del metabolismo oxidativo, el estrés oxidativo, las rutas de nutrientes, y las rutas de estrés sobre el envejecimiento	131
5	ESTRÉS OXIDATIVO: ¿PERJUDICIAL O BENEFICIOSO?	133
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>136</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>137</b>



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. ESTRÉS AMBIENTAL Y RESPUESTA CELULAR**

Tanto los organismos unicelulares como los organizados en tejidos y estructuras más complejas tienen que hacer frente, en todo momento, a posibles cambios en las condiciones que les rodean; temperatura, presión, radiación, pH, disponibilidad de nutrientes son sólo algunos de los factores que pueden variar repentinamente, causando una nueva condición del medio y provocando un estrés ambiental.

En respuesta a una condición de estrés, las células activan y coordinan una serie de actividades intracelulares específicas para responder, adaptarse y aumentar la probabilidad de sobrevivir y proliferar. Esta respuesta implica un estricto control del crecimiento, así como modificaciones en los programas de expresión génica y de la actividad metabólica.

El objetivo fundamental de la respuesta a estrés es proteger a la célula de los efectos adversos del mismo y reparar los posibles daños causados.

Es motivo de interés, y objetivo de muchas investigaciones, el averiguar cómo las células sensan los diferentes estímulos provocados por las diferentes condiciones de estrés y cómo responden a tales provocaciones.

### **1.1 Respuesta celular a estrés**

Dependiendo del tipo de estrés que se llegue a provocar también varía el tipo de respuesta que la célula activa. Hay etapas de la respuesta a estrés que se pueden considerar comunes para todo tipo de variación ambiental. En primer lugar la célula sufre unos cambios inmediatos como consecuencia directa de la exposición al estrés. Estos daños varían en función del tipo de estrés y pueden incluir, entre otros, cambios en la morfología celular o daños directos a proteínas, DNA u otras macromoléculas.

Una vez percibido el cambio en el medio externo, y los consecuentes daños intracelulares, se activa la fase de respuesta, que normalmente implica la puesta en marcha de programas específicos de regulación en la expresión génica y un cambio de las condiciones metabólicas, necesarios para adaptarse a la nueva condición de estrés.

En la última fase, la de adaptación, se restablecen las actividades celulares, el crecimiento y la proliferación, gracias a los mecanismos activados por los efectores.

A veces, si el daño causado por el estrés ha sido demasiado elevado o la célula no es capaz de activar una respuesta suficientemente válida, puede que la solución elegida no sea la de adaptación si no la de muerte celular.

Aún existiendo estas características comunes, hablando de respuesta a estrés hay que distinguir dos diferentes tipos de mecanismo: una respuesta global a diferentes condiciones adversas y la activación de rutas más específicas ante un solo tipo de estrés.

### 1.1.1 Mecanismos globales de respuesta a estrés

Hablamos de respuesta global cuando un mismo sistema se activa frente a diferentes estímulos. Generalmente el mecanismo de respuesta global se compone de unos sensores, una cadena de transducción de la señal y unos efectores. Mientras sensores y efectores pueden ser específicos para las diferentes condiciones, lo que caracteriza la globalidad de la respuesta es el módulo de transducción de la señal que resulta ser el mismo para los diferentes estreses. Uno de los más importantes mecanismos globales de respuesta a estrés es el que utiliza el módulo de las quinasas MAP.

Las cascadas de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) son las principales vías de señalización de los estímulos en las células eucariotas. Estas vías responden tanto a estímulos extracelulares como intracelulares y se caracterizan por poseer un módulo citoplasmático de tres quinasas conservadas: la MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa)

o MEKK, la MAPKK (MAP quinasa quinasa) o MEK y la MAPK (MAP quinasa), que se activan de forma secuencial para fosforilar a la siguiente quinasa del módulo, hasta llegar a la fosforilación y activación de la MAPK.

El módulo de las MAPK recibe señales activadoras desde un sensor, generalmente ubicado en la membrana plasmática, a través de un sistema de transferencia de fosfato o de una proteína G, y que culmina en la activación de la MAPKKK por fosforilación o por interacción con otras proteínas. Una vez activa, la MAPKKK fosforila, en residuos serina y treonina a la MAPKK, activándola. Ésta, a su vez, fosforila en residuos treonina (a veces serina) y tirosina y activa a la MAPK. La forma activa de la MAPK se transloca al núcleo, donde fosforila y activa a los factores de transcripción que se encuentran bajo su control, a proteínas del citoesqueleto o a otros sustratos con actividad quinasa o fosfolipasa (Roux and Blenis, 2004).

Característica de los módulos de MAPK es que existe siempre una única MAPK y varias MAPKK y MAPKKK. Este hecho permite que diferentes vías de MAPK puedan compartir algunos componentes: de esta forma, diferentes vías pueden interconectarse entre ellas, y los diferentes estímulos pueden activar la vía a través de diferentes componentes. Además, existe un mayor número de moléculas de MAPK que de MAPKK y de MAPKKK en la célula, lo que permite la amplificación de la señal.

La especificidad de la señal se logra gracias al uso de motivos específicos de unión, proteínas “scaffold”, que se hallan unidas a la vez a diferentes componentes del módulo, organizándolos, y gracias a la distinta localización de los diferentes elementos (Chang and Karin, 2001; Garrington and Johnson, 1999; Roux and Blenis, 2004).

Otros aspectos importantes son la duración y la magnitud de la activación porque una hiper activación de la ruta puede producir efectos letales para la célula. Por esta razón hay una regulación negativa de las vías de MAPK, a cargo de proteínas fosfatasas, que defosforilan e inactivan a la MAP quinasa para asegurar la adecuada intensidad de la

señal y el preciso momento de la activación. Se conocen tres tipos diferentes de fosfatasa: tirosín fosfatasa, serín treonín fosfatasa o fosfatasa de doble especificidad que remueven el fosfato de las tirosinas, treonina o ambos aminoácidos respectivamente (Martin and Hall, 2005; Saxena and Mustelin, 2000).

En células de mamífero se han caracterizado cinco distintos grupos de MAPK: las quinasas ERK 1 y 2 (Extracellular-Regulated Kinase), las Jun quinasas (JNKs), la MAPK p38, las ERK 3 y 4, la ERK 5. Las vías más estudiadas son la de las quinasas ERK 1 y 2, activadas preferentemente por factores de crecimiento, y las quinasas JNKs y p38 que responden principalmente a condiciones de estrés (Roux and Blenis, 2004). En modelos eucariotas unicelulares, como la levadura, también se halla este mecanismo de respuesta, a veces utilizado frente a condiciones específicas de estrés, como es el caso de la MAP quinasas Hog1, que responde principalmente a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae*, a veces en respuesta a diferentes tipos de estrés, como es la activación de la MAP quinasas Sty1 en *Schizosaccharomyces pombe*, descrita más adelante en esta introducción.

#### 1.1.2 Tipos de estrés y respuestas globales o específicas de cada uno

En la activación de una ruta global de respuesta a estrés la especificidad se encuentra en el tipo de sensor, efector y proteínas “scaffold” que están involucrados en la respuesta pero hay situaciones donde la respuesta activada frente a una condición de estrés no es una ruta de respuesta global, si no que un sistema totalmente específico para una condición y que no comparte mecanismos con otras respuestas.

Analizando la respuesta a los más frecuentes estreses ambientales veremos como en cada situación podemos encontrar la activación de una respuesta global, totalmente específica, o la activación de ambos mecanismos.

### 1.1.2.1 Estrés por calor

El estrés por calor se define como la exposición a una temperatura diferente a la habitual para el crecimiento óptimo de la célula. Los daños más significativos causados en esta condición son la pérdida de la integridad de la membrana y la desnaturalización y agregación de proteínas. Variaciones de temperatura demasiado elevadas pueden causar la muerte celular mientras que cambios más leves pueden activar una serie de respuestas a este tipo de estrés, entre las cuales destacan la activación de la producción de proteínas chaperonas Heat Shock Protein (HSP) y la síntesis de trehalosa. Ambas respuestas se activan también frente a otros tipos de estrés pero en esta condición se presentan de forma más acentuada.

El estrés por calor activa sistemas de respuesta comunes a las respuestas a otros tipos de estrés, como la parada del ciclo celular, cambios en la composición de la pared o estimulación de la actividad ATPasa, pero los efectos más remarcables frente a esta condición son la activación del factor de transcripción Heat Shock Factor (HSF) con el consiguiente incremento de la síntesis de HSPs, y la síntesis de trehalosa, que llega a alcanzar porcentajes más elevados respecto a la producción frente a otros tipos de estrés.

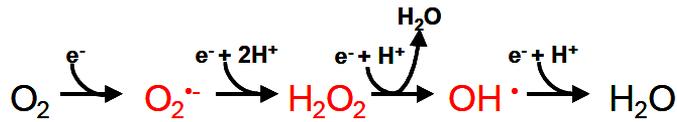
La regulación transcripcional mediada por el factor HSF es un mecanismo evolutivamente muy conservado pero mientras que nematodos, levaduras y moscas de la fruta poseen un solo factor HSF, los vertebrados y las plantas se caracterizan por tener una entera familia de factores HSF. Los miembros de esta familia pueden ser expresados como monómero o dímero inertes pero, para poder funcionar como factores de transcripción, los HSF tienen que formar en primer lugar un homotrímero y, seguidamente, se tienen que unir a elementos para la respuesta a calor (Heat Shock Elements, HSEs) situados en los promotores de los genes diana. Las condiciones que regulan este tipo de transcripción suelen ser de estrés pero también hay activación de algunos HSF en condiciones fisiológicas. Entre los genes diana de los factores

HSF encontramos los que codifican para las HSP, que interaccionan con las proteínas desnaturalizadas por el cambio térmico, ya sea uniéndose a las zonas hidrófobas de estas últimas y evitando su agregación, o bien facilitando la degradación de las proteínas dañadas irreversiblemente.

Otro factor a tener en cuenta durante la respuesta a estrés por calor es la hiper producción de trehalosa. Este disacárido, altamente hidrófilo y químicamente estable, se conoce principalmente como reserva energética en las células en condición de fase estacionaria y en las esporas, pero numerosos estudios han puesto en evidencia la capacidad de la trehalosa de estabilizar las proteínas en sus estados nativos e, incluso, de prevenir agregados proteicos en respuesta a estrés por calor. Por otra parte, si la trehalosa persiste en altas dosis después del estrés, puede interferir con la función reparadora de las proteínas HSP sobre las proteínas desnaturalizadas por el estrés térmico (Gray et al., 2004).

#### 1.1.2.2 Estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), que incluyen el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), se producen a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular durante procesos metabólicos como la respiración o tras la exposición a ciertos agentes ambientales como las radiaciones UV o los metales pesados. Estas ROS pueden reaccionar con biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA, inactivando su función, y por eso se define estrés oxidativo como la situación en la cual se produce un incremento en la concentración intracelular de ROS, como consecuencia de un aumento en la producción (debido a cambios metabólicos, exposición a radiaciones o a drogas) o por disminución en la capacidad detoxificante de las mismas (por daños en los enzimas detoxificantes o mutaciones en genes de componentes de sistemas detoxificantes) (Fig. 1).

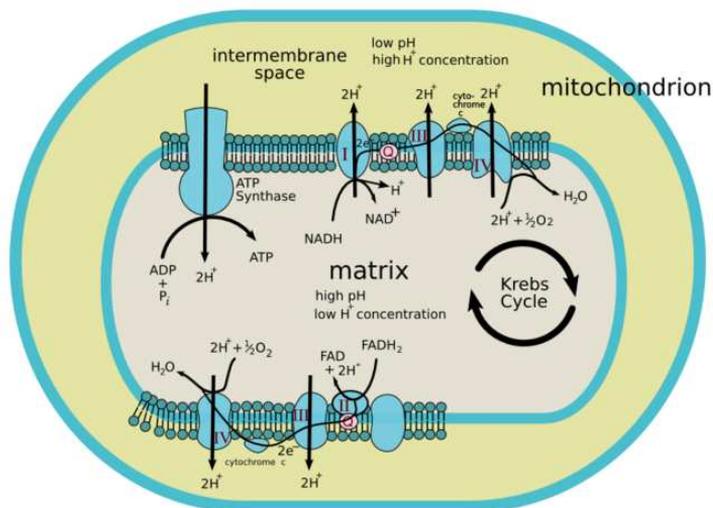


**Figura 1.** Las especies reactivas del oxígeno (ROS), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ).

En aerobiosis, la principal fuente de ROS es la cadena de transporte electrónico mitocondrial, donde los electrones de flavinas reducidas  $\text{FADH}_2$  (flavina adenina dinucleótido) y  $\text{NADH}$  (nicotinamida adenina dinucleótido) provenientes de la glicólisis o del ciclo de Krebs fluyen hasta el  $\text{O}_2$  a través de la cadena respiratoria, formada por cuatro complejos: tres bombas de protones y una conexión física con el ciclo de Krebs. Los complejos son:  $\text{NADH}$  deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), citocromo *c* reductasa (complejo III) y citocromo *c* oxidasa (complejo IV). El flujo de electrones entre estos complejos transmembranales provoca el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Los electrones fluyen a través de los complejos por transferencia a grupos flavinas, centros hierro-sulfuro ( $\text{FeS}$ ), grupos hemo e iones cobre que poseen las proteínas de estos complejos. La ubiquinona y el citocromo *c* son las proteínas encargadas de transportar los electrones desde un complejo al siguiente. Así, los electrones se transfieren desde la  $\text{NADH}$  deshidrogenasa hacia la citocromo *c* reductasa mediante la ubiquinona. Esta última también transporta electrones provenientes del  $\text{FADH}_2$ , generados por la succinato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs, hacia la citocromo *c* reductasa. El citocromo *c* transporta electrones desde la citocromo *c* reductasa a la citocromo *c* oxidasa, el componente final de la cadena y el que cataliza la reducción del  $\text{O}_2$ . La succinato deshidrogenasa, a diferencia de los otros complejos, no bombea protones.

Cualquiera de estos grupos es susceptible de donar un electrón al  $\text{O}_2$  en lugar de al siguiente componente de la cadena, generándose así el ión

$O_2^{\bullet -}$ . La reducción puede seguir hasta la formación de  $H_2O_2$  por superposición de orbitales moleculares entre el dador electrónico y el anión  $O_2^{\bullet -}$ . Este proceso genera una mezcla de  $O_2^{\bullet -}$  y  $H_2O_2$  en proporción diferente entre los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico. El bloqueo del transporte de electrones a lo largo de la cadena, tanto por el uso de inhibidores como por la presencia de mutaciones genéticas que afectan el funcionamiento de uno o más complejos, provoca un aumento en el escape de electrones y un consecuente aumento del nivel de estrés oxidativo endógeno (Fig. 2).



**Figura 2. Producción y detoxificación de ROS en las células eucariotas.**

$OH^{\bullet}$  es la más reactiva de las ROS. Se produce por la reacción de Fenton, en presencia de metales, como se describe más adelante (ver apartado 1.1.2.3). Respecto a  $OH^{\bullet}$ , el anión  $O_2^{\bullet -}$  y el  $H_2O_2$  tienen reactividad limitada: en el primer caso por su carga negativa real que limita su capacidad de oxidar moléculas con alta densidad electrónica y la posibilidad de atravesar membranas, en el segundo porque el enlace O-O limita la reactividad.

La capacidad de las ROS de reaccionar con todas las biomoléculas (DNA, glúcidos, lípidos y proteínas) constituye su mecanismo de toxicidad. El anión  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  son capaces de oxidar clusters FeS de ciertas enzimas, provocando la desintegración de los centros y, por lo tanto, la pérdida funcional del enzima (Flint et al., 1993a; Flint et al., 1993b). Otra consecuencia de la inactivación de los centros FeS es que el hierro, proveniente de los mismos, se acumula provocando mutagénesis del DNA, debido a la aparición del radical hidroxilo por la reacción de Fenton (Keyer and Imlay, 1996).

El  $OH^{\cdot}$  y el  $H_2O_2$  pueden oxidar algunos aminoácidos introduciendo grupos carbonilos, tanto en la cadena principal, provocando su ruptura, como en las cadenas laterales. Durante el envejecimiento de la célula aumenta el nivel de los derivados carbonilados, lo que relaciona el envejecimiento celular con la oxidación proteica (Stadtman, 1992).

A nivel de lípidos y DNA, los daños más graves son provocados por el  $OH^{\cdot}$ . En el primer caso, el radical causa la peroxidación de los lípidos de membrana, lo que produce cambios de las características físico-químicas de estas como la disminución de la fluidez, y cambios en la interacción con proteínas (Czapski, 1984).

Sobre el DNA el radical hidroxilo interviene oxidando tanto los azúcares como las bases nitrogenadas, generando un amplio abanico de lesiones (Dizdaroglu, 1991; Hutchinson, 1985).

Además de la activación de la respuesta común a diferentes tipos de estrés, como la producción de proteínas chaperonas HSP, de proteínas de la maquinaria proteolítica y la activación de enzimas que redirigen el metabolismo hacia la síntesis de trehalosa, en respuesta a estrés oxidativo la célula activa rutas de señalización y factores de transcripción específicos que activan la expresión de proteínas antioxidantes encargadas de reestablecer los niveles redox intracelulares y de reparar los desperfectos causados por estos oxidantes.

Entre las actividades detoxificantes capaces de eliminar ROS se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), unas enzimas con átomos

metálicos en sus centros activos encargadas de catalizar la dismutación del  $O_2^{\bullet -}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , manteniendo así bajos los niveles de anión superóxido. Además, otros enzimas como la catalasa, la glutathion peroxidasa y la peroxirredoxina se encargan de mantener bajos los niveles de  $H_2O_2$  catalizando su descomposición en  $O_2$  y  $H_2O$ , o utilizando residuos de cisteína para reducir peróxidos.

Por otro lado, el glutathion y la tioredoxina de forma no enzimática, y la glutarredoxina, con actividad enzimática, reparan los daños inducidos por las ROS, reduciendo los puentes disulfuro generados por la oxidación de los residuos de cisteína de ciertas proteínas. El glutathion y la tioredoxina, además, son necesarias para la actividad catalítica de la glutathion peroxidasa y la peroxirredoxina, participando así también en los procesos de reducción de los peróxidos.

Otras moléculas que actúan como antioxidantes de forma no enzimática son las vitaminas C y E, las más abundantes vitaminas hidrosolubles y liposolubles, respectivamente. La vitamina E es una de las más eficaces moléculas con actividad de freno de reacciones en cadena y la principal molécula antioxidante que actúa sobre la peroxidación lipídica. La vitamina C actúa a nivel citosólico como antioxidante y participa en la reducción de la vitamina E.

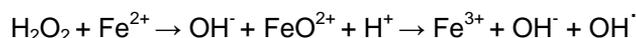
### 1.1.2.3 Estrés por metales pesados

Los metales son esenciales para la vida porque tienen papeles en diferentes procesos biológicos, como ser cofactores de enzimas o actuar como donadores o aceptores de electrones, según su estado iónico, en gran variedad de reacciones bioquímicas. Sin embargo, una acumulación excesiva de los mismos puede tener efectos dañinos por su unión a DNA, proteínas y lípidos y por esta razón la célula tiene mecanismos de homeostasis de los metales capaces de sensor la concentración intracelular y regular en consecuencia la entrada y la distribución de éstos.

Entre los metales potencialmente tóxicos, pero esenciales para el normal metabolismo, encontramos hierro, cobre, zinc, manganeso,

arsénico, cromo, mercurio, níquel y vanadio; una ineficiencia en el metabolismo de la mayoría de estos metales provoca, en humanos, condiciones degenerativas incluyendo neurotoxicidad, genotoxicidad y carcinogénesis (Stohs and Bagchi, 1995; Valko et al., 2005).

El daño más importante provocado por un incremento en la concentración de metales pesados es la producción de ROS. Metales y estrés oxidativo se relacionan a través de la reacción de Fenton:



Esta reacción, catalizada por iones metálicos, lleva a la producción de  $\text{OH}^\cdot$ , la forma más dañina entre las especies reactivas del oxígeno, con consecuentes daños a DNA, proteínas y lípidos.

Una desregulación en la concentración de metales puede alterar, además, el normal comportamiento celular influyendo sobre la actividad de muchos factores de transcripción y traducción, que dependen de la presencia de metales para el correcto funcionamiento, o induciendo una respuesta general a estrés (DeMoor and Koropatnick, 2000).

El estrés provocado por la presencia de  $\text{OH}^\cdot$  desencadena los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo descritos anteriormente, como la síntesis de glutatión y SOD, que se unen a los iones metálicos, inactivándolos.

Además, el estrés producido por un balance incorrecto de iones metálicos activa mecanismos de defensa específicos para esta condición.

Por una banda la célula es capaz de activar transportadores de iones metálicos que permiten expulsar o capturar metales a través de la membrana plasmática, además de regular su transporte y almacenamiento. Este tipo de respuesta, predominante en bacterias, es la forma más definitiva de responder al estrés porque elimina del metabolismo la posible fuente tóxica (Avery, 2001; Silver, 1996).

Por otro lado, la célula responde activando mecanismos de secuestro que reducen la toxicidad de los metales pero sin eliminarlos del metabolismo. Los ligandos que se utilizan pertenecen principalmente a dos clases de péptidos: las metalotioneínas y las fitoquelatinas. Las primeras son una clase de proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteínas y que se unen a los iones metálicos, para quelarlos, protegiendo así las células de su toxicidad y regulando su homeostasis. La inducción de la síntesis de metalotioneínas se realiza a nivel transcripcional y generalmente se encuentran, en el promotor de sus genes, distintos elementos reguladores como elementos para un factor de transcripción metal-dependiente, elementos que depende del estado redox de la célula (elementos ARE) o de la concentración de glucocorticoides (elementos GRE). Las metalotioneínas están presentes tanto en procariontas como en eucariotas inferiores y superiores y, dependiendo del organismo, el número de distintas metalotioneínas y la especificidad por un determinado tipo de metales varían. Así, por ejemplo, en eucariotas superiores las metalotioneínas MT-I y MT-II responden a una elevada concentración de zinc mientras que, en la levadura *S. cerevisiae*, el zinc es compartimentalizado en vacuolas y vesículas, mientras que las metalotioneínas Cup1 y Crs5 sirven para regular la toxicidad del cobre (Borrelly et al., 2002).

Las fitoquelatinas se encuentran especialmente en plantas y hongos, se sintetizan a partir de glutatión y sirven principalmente para la detoxificación de cadmio y cobre. A menudo la síntesis de fitoquelatinas sirve para internalizar los iones metálicos en vacuolas (Grill et al., 1985).

#### 1.1.2.4 Estrés osmótico

La actividad del agua se define como el potencial químico del agua libre en solución; variaciones en este potencial, que en la naturaleza pueden ser numerosas y repentinas, causan uno de los estreses ambientales más comunes, el estrés osmótico. Las células pueden tener que enfrentarse tanto a una situación de choque híper-osmótico, que

causaría salida de agua y pérdida de volumen, como a un choque hiposmótico, con efectos contrarios a la situación anterior. Generalmente es la condición de choque hiper-osmótico la que se define como estrés osmótico.

Una célula expuesta a un medio con elevada osmolaridad puede deshidratarse, sufrir un colapso de los sistemas de transporte iónico con un incremento en la concentración de biomoléculas e iones que puede, incluso, causar la pérdida de la viabilidad. Las alteraciones del volumen celular causan también cambios en la estructura real. El estrés osmótico puede dañar aspectos importantes de la fisiología celular como el crecimiento, el transporte vesicular y el nivel estructural de las membranas, incluyendo la expresión de genes del metabolismo lipídicos, la flexibilidad y permeabilidad de la membrana celular.

Por estas razones es importante mantener un potencial citosólico y de las organelas más bajo que el del entorno, para mantener el volumen celular y las actividades bioquímicas apropiadas y para seguir manteniendo una entrada controlada de agua en la célula. Los mecanismos que se han desarrollado para responder a cambios imprevistos en la actividad del agua actúan en pocos segundos, porque la entrada o la salida pasiva de agua ocurren muy rápidamente.

En ocasiones, el estrés osmótico viene acompañado de un estrés salino, debido a un descontrol en el balance de iones y cationes, que puede ser tóxico para la célula.

La regulación de estos niveles se lleva a cabo a través de bombas iónicas específicas de las membranas plasmáticas y vacuolares y de reguladores específicos del potencial de membrana.

El primer paso en la respuesta frente a un estrés osmótico es la activación de proteínas osmosensoras, generalmente proteínas integrales de membrana, que detectan cambios en las características fisicoquímicas del solvente y activan la respuesta apropiada. En todas las células eucariotas, esta respuesta está regulada por rutas de MAPK: JNKs y p38, Hog1 y Sty1 son las quinasas responsables en células de mamífero, en

las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* respectivamente (de Nadal et al., 2002).

La respuesta desencadenada frente a un estrés osmótico, de forma MAPK dependiente, incluye la modulación de diferentes aspectos biológicos, como la expresión génica, la progresión del ciclo celular y la síntesis de nuevas proteínas, pero el aspecto que más caracteriza la respuesta específica frente a este tipo de daño es la producción de osmolitos, siendo el glicerol el más común, que permite una adaptación metabólica creando un balance entre osmolaridad interna y externa.

Debido a que un estrés osmótico puede aportar graves daños biológicos y fisiológicos a la célula, paralelamente a la producción de osmolitos se observa, además, la activación de bombas iónicas y de una respuesta para la integridad celular, con la finalidad de preservar la integridad de las membranas y de las macromoléculas intracelulares, hasta que la acumulación de los solutos haya completado. La regulación de este mecanismo de defensa no se lleva a cabo por la actividad de la sola ruta MAPK, sino que implica la interacción de diferentes mecanismos de regulación, como pueden ser la ruta de TOR, PKA o la activación de proteínas quinasas C (Barba et al., 2008; Hohmann, 2002; Sheikh-Hamad and Gustin, 2004). Ejemplos de este tipo de respuesta son la síntesis de proteínas chaperonas, incluyendo algunas HSP, o síntesis de trehalosa, como reserva de carbohidratos (Estruch, 2000; Hohmann, 2002).

#### 1.1.2.5 Estrés nutricional

La falta repentina o la disminución gradual de un nutriente normalmente utilizado por las células como fuente de energía se puede considerar una condición de estrés.

Los nutrientes que pueden llegar a faltar pueden ser muy distintos (glucosa, nitrógeno, fósforo, azufre como ejemplos) e igual de numerosos son los tipos de respuesta activados frente a estas condiciones. Además, tendremos diferentes respuestas dependiendo del mecanismo de señalización del nutriente en cuestión, de la interconexión entre diferentes

mecanismos de respuesta sobre el mismo nutriente, de si las células que sufren el estrés están organizadas en tejidos u órganos o son cultivos unicelulares y, en ese caso, si son células haploides, de sexos distintos o no, o diploides.

Dentro de esta gran variedad de respuestas una ruta muy conservada entre todas las células eucariotas es la ruta de la quinasa TOR (Target Of Rapamycin). El antibiótico rapamicina se une a la proteína FKBP12 formando un complejo que inhibe TOR mediante la unión a su dominio FRB, pero solamente algunas de las funciones de TOR se ven inhibidas por el antibiótico. Esta diferencia en la respuesta frente a tratamiento con rapamicina se explica por el hecho de que TOR forma, junto con otras proteínas, dos complejos con funciones distintas: TORC1 y TORC2 (Wullschleger et al., 2006). Mientras en levadura existen dos genes TOR, en organismos superiores generalmente sólo hay uno pero, tanto en eucariotas superiores como inferiores, las proteínas TOR forman los dos complejos. Normalmente TORC1 es sensible a rapamicina y regula varios aspectos del crecimiento celular como transcripción, traducción, biogénesis de ribosomas, autofagia y metabolismo. Este complejo es el encargado de sensor nutrientes, factores de crecimiento y, en el caso de eucariotas superiores, niveles de energía. El complejo TORC2 es insensible a rapamicina y es el encargado de regular el crecimiento celular a nivel espacial, controlando la organización de la actina (Jacinto, 2008; Wullschleger et al., 2006).

La respuesta mediada por TOR, en el caso de eucariotas superiores, permite integrar la señal de escasez de nutrientes con la de factores de crecimiento, coordinando el crecimiento celular con la progresión del ciclo (Fingar and Blenis, 2004). En el caso de eucariotas inferiores, como la levadura, responde principalmente a falta de nitrógeno aunque recientes estudios demuestran la fosforilación de TOR en *S. cerevisiae* en respuesta a falta de glucosa (Dechant and Peter, 2008).

Más adelante en esta introducción se entrará más en detalle sobre el estrés producido por escasez de nutrientes en la levadura *S. pombe*.

## **2 ASPECTOS GENERALES DE RESPUESTAS A ESTRÉS EN *Schizosaccharomyces pombe***

Debido a que las respuestas a estímulos parecen estar evolutivamente conservadas entre eucariotas inferiores y superiores, la levadura es un modelo eficiente y práctico para estudiar cómo los eucariotas sensan y responden a los estreses a nivel celular. La levadura mejor conocida a nivel molecular es *S. cerevisiae* pero los eucariotas superiores parecen tener una relación más estricta con *S. pombe* que con *S. cerevisiae* en cuanto a las respuestas a estrés; además, la fácil manipulación genética de esta levadura, la completa secuenciación de su genoma y la identificación de una respuesta a estrés homologa a la de los eucariotas superiores, nos permite utilizar *S. pombe* como modelo ideal para la respuesta a estrés.

### **2.1 Respuesta global**

La levadura *S. pombe* es capaz de activar una respuesta común a diferentes estímulos ambientales, respondiendo, con los mismos componentes de señalización, a diferentes tipos de estrés. Numerosos estudios de cambios en el transcriptoma en respuesta a diferentes tipos de estrés, utilizando la técnica de los microarrays, han permitido confirmar que esta levadura responde a los estreses ambientales con una expresión génica global, definida como CESR (Core Environmental Stress Response), paralelamente a la inducción de ciertos genes que forman la respuesta específica a un determinado tipo de estrés, que se define como SESR (Specific Environmental Stress Response) (Chen et al., 2003; Chen et al., 2008).

La función que tienen los genes CESR confirma que éste es un sistema global de respuesta: muchos de ellos están implicados en responder a condiciones de estrés, incluyendo genes para el metabolismo de los carbohidratos, para la detoxificación de ROS, genes que regulan el metabolismo de las proteínas, la defensa contra daño al DNA o para su reparación.

Un mecanismo similar y ortólogo a la respuesta CESR, tanto a nivel de genes inducidos como reprimidos, se halla en la levadura *S. cerevisiae* (Gasch et al., 2000; Gasch and Werner-Washburne, 2002).

Como en todas las células eucariotas, también en *S. pombe* existe un módulo de MAP quinasas para una respuesta global a estrés: la MAPK que se activa al final de la cadena, Sty1, regula la transcripción de la mayoría de los genes CESR, pero controla en menor medida la respuesta SESR (Chen et al., 2003)

### 2.1.1 Ruta de la MAP quinasa Sty1

La vía de la MAP quinasa Sty1, también conocida como Spc1 o Phh1, es la principal ruta de respuesta global en *S. pombe*. La falta de Sty1 o de otros componentes de la cadena afecta a la viabilidad en fase estacionaria, confiere esterilidad a las células y las hace sensibles a estrés oxidativo y osmótico, radiaciones UV, estrés por calor, por metales pesados y cationes (Degols and Russell, 1997; Rodriguez-Gabriel and Russell, 2005; Toone et al., 1998; Wang et al., 2005; Wilkinson et al., 1996).

La mayoría de los componentes de la ruta de Sty1 se han identificado a nivel genético, aunque sus papeles en la transmisión de la señal están todavía en fase de estudio. El módulo central consiste en la MAP quinasa (MAPK) Sty1, la MAPK quinasa (MAPKK) Wis1, que fosforila la quinasa Sty1 en los residuos tirosina (Tyr-173) y treonina (Thr-171), y las MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) Wak1 (también conocida como Wis4) y Win1, que activan por fosforilación a la única diana Wis1 y son funcionalmente redundantes (Shiozaki and Russell, 1996; Shiozaki et al., 1997; Wilkinson et al., 1996).

Por encima de este módulo central, las histidin-quinasa Mak1, 2 y 3 actúan como sensores de los estímulos y activan el módulo de MAP quinasas. Este sistema de transferencia de fosfatos, homólogo al sistema bacteriano de señalización por dos componentes, se fosforila frente a un

estrés y, en consecuencia, fosforila al fosfotransmisor Spy1 encargado de transferir el fosfato a Mcs4, la proteína reguladora de la respuesta que, finalmente, transmite la señal a las MAPKKK Wak1 y Win1 (Aoyama et al., 2001; Buck et al., 2001; Nguyen et al., 2000; Shiozaki et al., 1997). Actualmente se desconoce cómo el mecanismo de transmisión de la señal, Mak1-3/Spy1/Mcs4, funciona a nivel molecular, pero diferentes estudios hacen pensar que el proceso sea similar a lo que ocurre en la levadura *S. cerevisiae* donde el sistema homólogo, Sln1/Ypd1/Ssk1, se mantiene fosforilado en ausencia de estrés y eso implica que la fosforilación de Ssk1 no permite su interacción con el módulo central de MAP quinasas que, de ese modo, se mantiene inactivo (O'Rourke et al., 2002).

La principal proteína diana de la ruta de Sty1 es la proteína Atf1, un factor de transcripción con un dominio b-ZIP de unión al DNA, cuya fosforilación por parte de Sty1 en respuesta a estrés se ha caracterizado tanto *in vivo* como *in vitro* (Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson et al., 1996). Atf1 se encuentra constitutivamente en el núcleo y actúa como factor de transcripción solo o formando un heterodímero con el factor de transcripción Pcr1, dependiendo de la condición de estrés (Kano et al., 1996; Sanso et al., 2008; Wahls and Smith, 1994).

Otros sustratos de Sty1 fosforilado son las quinasas Cmk2, implicada en respuesta a estrés oxidativo (Sanchez-Piris et al., 2002) y Srk1 que tiene un papel en el control de la meiosis (Asp and Sunnerhagen, 2003; Lopez-Aviles et al., 2005; Smith et al., 2002). Otra proteína cuya activación depende de Sty1 (aún por determinar si de forma directa o indirecta) es Csx1, que se une y estabiliza el mRNA de *atf1* en respuesta a estrés oxidativo (Rodriguez-Gabriel et al., 2003). La activación de esta proteína ocurre también por fosforilación por parte de la quinasa Lkh1 (Kang et al., 2007).

Existen evidencias genéticas de que existen más proteínas diana de Sty1, aún por describir.

Todavía no está establecido a nivel molecular cuales componentes de la cadena son necesarios por cada tipo de estrés. Se conoce que la

fosforilación de Sty1 es transitoria gracias a la acción de las fosfatasa Pyp1/Pyp2 y Ptc1/Ptc3 y que Pyp1, además, tiene un papel en la respuesta a estrés por calor y por arsenito, como se describe más adelante (ver apartado 2.2.1). Respecto a la respuesta frente a estrés oxidativo se ha descrito un papel específico para las histidin-quinasa Mak2 y Mak3 (Buck et al., 2001). Mak1, al contrario, no está implicada en esta respuesta pero regula una segunda proteína, Prr1. Esta proteína actúa como un factor de transcripción capaz de activar la transcripción de algunos genes como *trr1* y *ctt1*, inducidos en respuesta a estrés oxidativo (Ohmiya et al., 1999), así como del gen *ste11* esencial para la entrada en meiosis (Ohmiya et al., 2000).

No se ha determinado aún si Sty1 es capaz de activar la transcripción uniéndose directamente a los promotores de algunos genes o si solamente activa los mecanismos de respuesta a través de la activación de los factores de transcripción (Fig. 3).

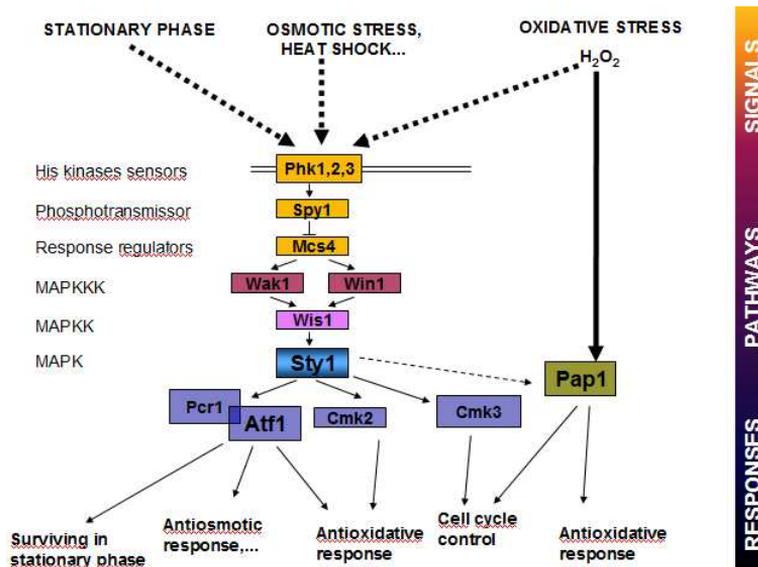
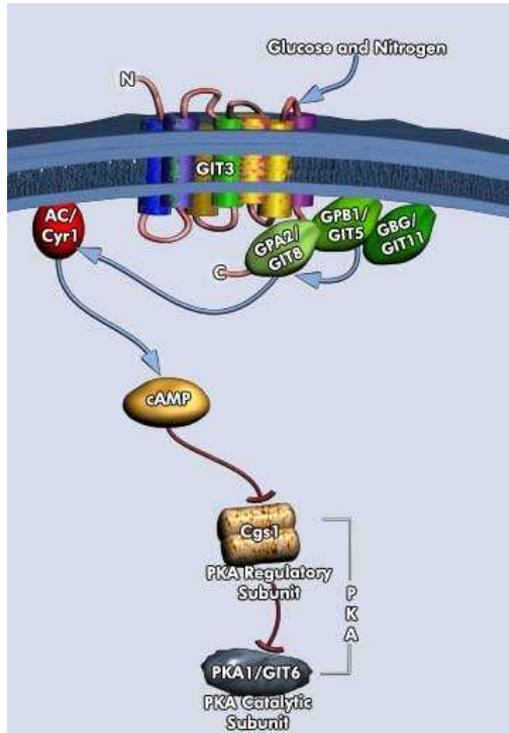


Figura 3. Rutas de respuesta a estrés en *Schizosaccharomyces pombe*.

### 2.1.2 Ruta de la quinasa Pka1

La ruta de la quinasa Pka1/Git6, contrariamente a lo que ocurre en la ruta de Sty1, normalmente regula de forma negativa la expresión de los genes de respuesta a estrés. Este mecanismo se ha visto involucrado en diferentes procesos celulares incluyendo diferenciación sexual, germinación de esporas, detección de glucosa, adaptación a la fase estacionaria, regulación del ciclo celular y respuesta a estrés osmótico (Hatanaka and Shimoda, 2001; Higuchi et al., 2002; Hoffman, 2005b; Yang et al., 2003). Sobretudo la investigación sobre el papel de Pka1 en la expresión de los genes *fbp1*, que codifica para el enzima fructosa-1-6-bifosfatasa, y *ste11*, responsable de la expresión de genes necesarios a la reproducción sexual, ha permitido averiguar como funciona el mecanismo de la ruta de Pka1. El nivel intracelular de AMP cíclico (cAMP) es el responsable de la activación de Pka1: este nucleótido es producido por el enzima adenilato ciclasa, Cyr1 (Git2) en *S. pombe*, dependiendo de la cantidad de ATP disponible en la célula, proporcional a la cantidad de nutrientes (Hoffman and Winston, 1991). La concentración de cAMP intracelular es el compendio de la actividad de la adenilato ciclasa por un lado y de la fosfodiesterasa por otro. Este ultimo enzima es responsable de convertir el cAMP en AMP y es codificado en *S. pombe* por el gen *cgs2* (DeVoti et al., 1991). Otras siete proteínas Git son las responsables de la activación de la adenilato ciclasa y se dividen en dos grupos funcionales. El primer grupo es formado por el receptor acoplado a proteína G (GPCR) Git3 y la proteína G heterotrimerica formada por las subunidades Git5  $G\beta$ , Git11  $G\gamma$  y Gpa2 (Git8  $G\alpha$ ) (Hoffman, 2005b). La Gpa2 es la responsable de activar a la adenilato ciclasa, debido a que un mutante constitutivamente activo de esta proteína es capaz de rescatar la falta de activación de Cyr1 en mutantes para los genes *git3* y *git5* (Fig. 4).



**Figura 4. Ruta Pka1 en *Schizosaccharomyces pombe*.**

Por otro lado las proteínas Git1, Git7 y Git10 son necesarias para activar la adenilato ciclasa también en células con Gpa2 siempre activa de forma que estas tres ultimas proteínas activan a Cyr1 de forma Gpa2 independiente o son necesarias para la activación Gpa2-dependiente (Alaamery and Hoffman, 2008; Hoffman, 2005b; Ivey and Hoffman, 2005; Welton and Hoffman, 2000).

La activación de la adenilato ciclasa por parte del sistema GPCR-proteínas G también ocurre en la levadura *S. cerevisiae* que además, contrariamente a *S. pombe*, puede activar este enzima a través de las proteínas Ras (Hoffman, 2005a).

En la levadura *S. cerevisiae* la falta de actividad quinasa de la PKA provoca una parada del crecimiento (Toda et al., 1987) mientras que en *S. pombe* no hablamos de parada pero sí de crecimiento más lento (Fujita and Yamamoto, 1998). Mutantes en *cyr1*, *pka1*, *gpa2* son capaces de proliferar vegetativamente pero muestran un crecimiento lento, células

fenotípicamente más cortas, alteración de la expresión génica y derrepresión del desarrollo sexual. Estos defectos pueden ser rescatados con la sobreexpresión de dos proteínas, *Sck1* y *Sck2* (Fujita and Yamamoto, 1998; Jin et al., 1995). Ambas proteínas son homologas a *Sch9* de *S. cerevisiae*, capaz de rescatar la parada de crecimiento de un mutante PKA (Toda et al., 1988; Toda et al., 1987). Las delecciones de *sck1* y *sck2* no producen un fenotipo particular pero el doble mutante tiene una frecuencia mucho más elevada de conjugación, también en presencia de nitrógeno (Fujita and Yamamoto, 1998).

Otra diferencia que se encuentra entre estas dos levaduras es el número de genes que codifican para la quinasa PKA: en *S. cerevisiae* la subunidad catalítica es codificada por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* mientras que en *S. pombe* solamente por el gen *pka1* (Maeda et al., 1994; Toda et al., 1987).

Con bajos niveles de AMP cíclico, la actividad de Pka1 es inactiva por la formación del complejo entre la subunidad catalítica Pka1 y la subunidad reguladora Cgs1 (DeVoti et al., 1991); al contrario, cuando la cantidad de AMP cíclico es elevada, Cgs1 y Pka1 no forman complejo y Pka1 adquiere su máxima actividad quinasa. De esta forma el sistema Pka1 permite desencadenar una reacción bioquímica intracelular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes.

La regulación de los genes *fbp1* y *ste11*, y probablemente de muchos otros, por parte de Pka1 funciona a través del factor de transcripción Rst2, que se une a los promotores de estos genes en la secuencia STRE (stress response element). En respuesta a la falta de nutrientes la cantidad de mRNA de Rst2 no varía, lo que indica que la actividad de Rst2 es regulada a nivel post-transcripcional. En un medio carente de glucosa, Rst2 se hiperfosforila, activándose, y Pka1 inhibe esta hiperfosforilación fosforilando el factor de transcripción en sitios específicos para la quinasa y causando su exclusión nuclear con un mecanismo aún por definir (Higuchi et al., 2002).

La respuesta a estrés mediada por AMP cíclico/Pka1 y la respuesta mediada por Sty1 a menudo regulan los mismos genes, revelando una

interconexión entre las dos rutas. Incluso se ha descrito que los mismos genes *pka1* y *cgs1* están regulados a nivel transcripcional por las dos rutas (Stiefel et al., 2004) Aún es difícil establecer si los dos mecanismos actúan de forma independiente o si uno es regulador del otro pero en la mayoría de los casos Pka1 y Sty1 actúan de forma antagonista: ese es el caso de la regulación de los genes *fbp1* y *ste11* en respuesta a fase estacionaria (Dal Santo et al., 1996; Stettler et al., 1996; Takeda et al., 1995) y del gen para la síntesis de trehalosa *tps1*, importante para la respuesta a estrés por calor (Degols et al., 1996; Fernandez et al., 1997).

## 2.2 Respuestas específicas a los diferentes tipos de estrés en *S. pombe*

### 2.2.1 Respuesta a estrés por calor

Contrariamente a la condición de estrés osmótico u oxidativo, donde la activación de Sty1 corre exclusivamente a cargo de la MAPKK Wis1, en respuesta a estrés por calor juegan un papel fundamental las fosfatasa Pyp1 y Pyp2. Estas fosfatasa son encargadas de defosforilar Sty1 en la tirosina 173 pero, cuando las células son expuestas a un choque térmico, la consecuente inhibición de estas fosfatasa combinada con la basal y moderada activación de Sty1 por parte de Wis1, conllevan a una fuerte activación de la quinasa. La consecuente atenuación de Sty1, una vez puesta en marcha la respuesta, corre a cargo de las fosfatasa Ptc1 y Ptc3 que defosforilan la treonina 171 de la quinasa (Nguyen et al., 2000).

La respuesta específica a estrés por calor consiste en la activación del factor de transcripción HSF. En la levadura *S. pombe* encontramos un solo HSF que es activado de forma post-traducciona sólo frente a estrés, contrariamente al HSF de *S. cerevisiae* que se encuentra unido a los sitios HSE de forma constitutiva (Gallo et al., 1993; Gallo et al., 1991). El factor HSF se activa de la misma forma frente a diferentes tipos de estrés pero las respuesta son específicas, dependiendo del tipo de estrés que

las ha impulsado, gracias a que el set de genes activado es distintos (Saltsman et al., 1999).

Respecto al metabolismo de la trehalosa, la activación transcripcional del gen de la trehalasa *ntp1*, que regula la concentración celular de trehalosa, es regulada positivamente por la ruta de Sty1/Atf1 y negativamente por la quinasa Pka1, pero, contrariamente a lo que ocurre frente a un estrés oxidativo u osmótico, Sty1 no tiene un papel en la regulación post-traducciona de la proteína Ntp1 en respuesta a estrés por calor. La regulación transcripcional de *ntp1* también se regula por el factor HSF, cuya unión a los sitios HSE en el promotor del gen parece depender de que Atf1 se una al promotor del mismo gen (Fernandez et al., 1997; Madrid et al., 2004)

### 2.2.2 Respuesta a estrés oxidativo

En la respuesta a estrés oxidativo en *S. pombe* participan tanto la ruta de respuesta general Sty1 como una respuesta específica, controlada por el factor de transcripción Pap1 y su activador Tpx1. La señal fisiológica que activa la respuesta a estrés oxidativo es la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todavía se desconocen cuales son los componentes de la ruta de señalización de la señal que activan a Sty1 frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lo que está descrito es que esta respuesta es dosis-dependiente: una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1-2 mM es la que provoca daño celular, pero no muerte, y activa a la ruta de Sty1.

#### 2.2.2.1 Pap1

Frente a bajas concentraciones de peróxido se activa la respuesta Pap1-dependiente. El factor de transcripción Pap1 (*pombe* AP-1) pertenece a la familia AP-1 de activadores de la transcripción y es homólogo a Yap1 de *S. cerevisiae*. Pap1 es regulado a nivel de localización subcelular; en estado basal, Pap1 está localizado en el citoplasma, mientras que su forma activa es nuclear. Pap1 posee señales de localización nuclear (NLS) y de exporte nuclear (NES). El NES se une

al factor de exporte Crm1 y este proceso es dominante sobre el importe en condiciones de no estrés. Después de una señal activadora de Pap1, se producen cambios conformacionales en la región que contiene el NES, impidiéndose la interacción con Crm1 (Toone et al., 1998). La inhibición del transporte nuclear de Pap1 conduce a la acumulación de éste en el núcleo y, con ello, a la activación transcripcional de sus genes diana (Castillo et al., 2002). El transporte nuclear de Pap1 depende además de Hba1, proteína con dominio de unión a Ran y que funciona como cofactor en el transporte de Pap1 y Sty1 del núcleo.

Las secuencias importantes para la activación de Pap1 son dos clusters ricos en cisteínas (Cysteine-Rich Domain, CRD): uno en la región central de la proteína (N-CRD) y otro en la región C-terminal (C-CRD), donde está ubicado el NES. El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca la formación de un puente disulfuro intramolecular en Pap1 entre la cisteína 278 (del N-CRD) y las cisteínas 501 o 532 (del C-CRD) (Castillo et al., 2002). El puente disulfuro provoca un cambio conformacional en Pap1 que impide la interacción con Crm1 y, por tanto, induce la acumulación nuclear de Pap1. La reducción del puente disulfuro de Pap1 se lleva a cabo a través de la actividad de la proteína Trr1 (tiorredoxina reductasa), cuya expresión depende de Pap1 que, de esta manera, se autorregula negativamente.

Pap1 transactiva genes implicados en vías de detoxificación celular como *ctt1* (catalasa), *trx2* (tiorredoxina), *trr1* (tiorredoxina reductasa), *tpx1* (tiorredoxina peroxidasa) y *pgr1* (glutathion reductasa), así como transportadores de membrana de tipo ABC como *hba2/bfr1* y *pmd1*. Estos genes forman parte de la respuesta que promueve Pap1 frente a un estrés oxidativo por baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (niveles óptimos para la activación: 0.2 mM); este tipo de adaptación prepara a las células para sobrevivir a un nuevo insulto de mayor concentración, controlado por la ruta de Sty1.

#### 2.2.2.2 Tpx1

Las dosis de  $H_2O_2$  óptimas capaces de activar la ruta de Sty1 (alrededor de 1 mM) no promueven una activación inmediata de Pap1 sino que inactivan esta ruta de forma temporal. La activación de genes como *srx1* (sulfirredoxina), *gpx1* (glutathion peroxidasa), *ctt1* por parte de Sty1/Atf1 permite bajar las concentraciones de  $H_2O_2$  a niveles capaces de activar al factor de transcripción Pap1. El sensor que reconoce este cambio y activa a Pap1 es la peroxirredoxina Tpx1. Esta proteína, con función similar a Gpx3 en *S. cerevisiae* en su actividad de sensor, es además esencial para la viabilidad de las células en condiciones aeróbicas, contrariamente a la delección o inactivación de Gpx3, que no presenta defectos en el crecimiento (Toledano et al., 2004; Vivancos et al., 2005) (Jara et al., 2007).

Tpx1 solamente puede transferir la señal redox a Pap1 en presencia de bajas dosis de  $H_2O_2$  porque, en presencia de elevadas dosis, el peróxido oxida a ácido sulfínico uno de los residuos de cisteína de la peroxirredoxina, inactivándola. Esto constituye la base de la activación dosis-dependiente de Pap1 por  $H_2O_2$ . La sulfirredoxina ATP-dependiente Srx1 es el enzima encargado de reactivar Tpx1, a través de la reducción del ácido sulfínico a grupo tiol (Bozonet et al., 2005; Vivancos et al., 2005).

El hecho de que la quinasa Sty1 sea la encargada de expresar Srx1 en presencia de  $H_2O_2$  explica cuál es la conexión entre las dos rutas, de Sty1 y de Tpx1/Pap1, en respuesta a estrés oxidativo. De hecho, la activación tardía de Pap1 frente a altas dosis de peróxido requiere la presencia de la ruta de Sty1 (Vivancos et al., 2004).

#### 2.2.2.3 Prr1

El gen *prr1* codifica para un factor de transcripción con homología a un regulador de la respuesta de los sistemas reguladores de dos componentes bacterianos y a Skn7 de *S. cerevisiae*. Prr1 posee en el

extremo C-terminal un dominio aceptor de fosfato con un residuo aspartato, lugar teórico de fosforilación, precedido de un dominio de unión a DNA homólogo al de HSF (heat shock factor) de mamíferos. Posee también una señal de importe nuclear.

La cepa delecionada en el gen *prp1* muestra fenotipo de sensibilidad a algunos agentes oxidantes, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y muestra sensibilidad a estrés por metales pesados. Se ha comprobado que Prr1 regula la inducción de los genes antioxidantes *ctt1* y *trr1*, que también dependen de Pap1 (Ohmiya et al., 1999).

La falta de Prr1 conduce a esterilidad por defectos en conjugación y/o formación de esporas (Ohmiya et al., 2000). Prr1 controla la inducción de *ste11*, que codifica para Ste11, factor que transactiva numerosos genes implicados en el desarrollo sexual.

Prr1 también participa en la inducción de genes Atf1 dependientes (Greenall et al., 2002).

### 2.2.3 Respuesta a estrés por metales pesados

La toxicidad de los metales pesados desencadena en *S. pombe*, como en el resto de eucariotas, la activación de la respuesta típica de estrés oxidativo, la producción de metalotioneínas y de fitoquelatinas. Otro aspecto fundamental es la correcta funcionalidad de los mecanismos de homeostasis de cada metal.

En la homeostasis del hierro, dos mecanismos distintos se ocupan de la internalización de los iones férricos y ferrosos; en el primer caso, proteínas sideroforas permiten la síntesis del ferrocromo, un compuesto orgánico de bajo peso molecular que se une al hierro en su estado férrico sin necesidad de reducirlo, mientras que en el segundo caso, primero hay una reducción del hierro por parte de la proteína reductasa Frp1, seguida del transporte del metal por parte de las proteínas Fip1 y Fio1. Los genes que codifican para las proteínas involucradas en ambos mecanismos son regulados transcripcionalmente por el factor Fep1 que, en condiciones de baja concentración de hierro, activa la expresión de estos genes y, al

mismo tiempo, inhibe la producción de proteínas que utilizan o almacenan hierro (Labbe et al., 2007).

La principal vía de detoxificación de cadmio en *S. pombe* es la producción de fitoquelatinas. Estas proteínas, producto de la fitoquelatinsintasa a partir de glutatión, se unen a los metales tóxicos formando complejos que serán secuestrados en organelos. La proteína de membrana de tipo ABC Hmt1, localizada en las membranas de las vacuolas, se une al complejo fitoquelatinas-metal y facilita el almacenamiento (Ortiz et al., 1992; Perego and Howell, 1997) aunque, recientemente, se ha descrito que la proteína Hmt1 depende de glutatión pero no de la presencia de fitoquelatinas para la detoxificación de cadmio (Preveral et al., 2009).

Otro gen implicado en la detoxificación del cadmio es el que codifica por el factor de transcripción Zip1. Esta proteína se produce constitutivamente pero su concentración intracelular es continuamente regulada por ubiquitinación por parte de la proteína Pof1 y su consecuente degradación en el proteasoma. La mayoría de los genes regulados por Zip1 son específicos de estrés por cadmio y su expresión es independiente de la ruta de Sty1/Atf1. La principal respuesta consiste en la producción de glutatión y en arrestar el ciclo celular. Células con deleción en *zip1* pierden viabilidad tras tratamiento con cadmio (Harrison et al., 2005). El mecanismo Pof1/Zip1 es un mecanismo conservado que se encuentra también en la levadura *S. cerevisiae*, con las proteínas Met30/Met4, y en mamífero con el complejo Cul3:Rbx1:Keap1/Nrf2 (Baudouin-Cornu and Labarre, 2006).

La falta de Zip1 también confiere sensibilidad a las células frente a tratamiento con arsenito. Otra ruta que regula la respuesta frente a ese tipo de estrés es la de la quinasa Sty1 (Rodríguez-Gabriel and Russell, 2005).

El transporte y almacenamiento del zinc se ven regulados por los transportadores de metales Zhf y SpZrt1 y por la metalotioneína Zym1. Zhf se expresa constitutivamente y se localiza en el retículo endoplasmático y en la membrana nuclear; su deleción hace que la célula

sea sensible a zinc, no pueda crecer a bajas concentraciones del mismo y disminuya su capacidad de almacenar este metal. Contrariamente a lo que ocurre con el zinc, la delección de *zhf1* confiere resistencia a cadmio, de forma fitoquelatinas-independiente (Clemens et al., 2002). La delección del transportador SpZrt1, el único sistema de captación de zinc hasta ahora descrito en *S. pombe*, tiene fenotipo parecido al descrito para Zhf (Boch et al., 2008). La exposición a zinc activa también la acumulación de la metalotioneína Zym1. La ruta de Sty1 regula positivamente la expresión de *zym1* pero no es obligatoria para la inducción de la proteína por parte del zinc. La delección de *zym1* confiere una débil sensibilidad a zinc mientras que la hiper activación del mismo rescata el fenotipo de sensibilidad del mutante *zhf*<sup>-</sup>. La falta de Zym1 también hace que la célula sea sensible a cadmio, contrariamente a lo que ocurre con falta de Zhf1 (Borrelly et al., 2002).

#### 2.2.4 Respuesta a estrés osmótico

Como en el resto de células eucariotas, la respuesta a estrés osmótico en *S. pombe* está controlada principalmente por la ruta de las MAP quinasas.

La condición de hiper ósmosis desencadena la síntesis de glicerol, cuyo primer paso es la transformación de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato, gracias a la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. En *S. pombe*, hay dos genes que codifican para esta enzima, *gpd1* y *gpd2*, pero, mientras que la expresión de *gpd2* es constitutiva, la de *gpd1* depende de la quinasa Sty1 y ocurre en respuesta a estrés osmótico (Aiba et al., 1995; Ohmiya et al., 1995). Los mutantes  $\Delta$ *sty1* son hipersensibles a diferentes agentes capaces de inducir estrés osmótico, lo que confirma que la quinasa Sty1 es necesaria para la inducción de la mayoría de los genes de respuesta a estrés osmótico. El heterodímero formado por los factores de transcripción Atf1 y Pcr1 es el principal responsable de la activación transcripcional activada por Sty1 pero, en el caso específico de un estrés osmótico, como un choque de

cloruro potásico, cloruro sódico o sorbitol, Pcr1 no es esencial para la supervivencia; además, la inducción de genes como *hsp9* o *gpd1*, depende de Atf1 pero no de Pcr1 (Sanso et al., 2008).

Otro gen cuya activación ocurre sólo frente a estrés osmótico es *cta3*, que codifica para un transportador intracelular de cationes y es regulado positivamente por la ruta de Sty1 y negativamente por los represores Tup11 y Tup12. Además, otra proteína involucrada en la regulación de *cta3* es el factor de transcripción Prr1. Esta proteína, importante sobre todo en la respuesta a estrés oxidativo, es necesaria, además, para activar, de forma Sty1-independiente, a genes como *gpx1* y *ctt1*, frente a estrés por exceso de potasio (Greenall et al., 2002). Curiosamente estos genes también están regulados positivamente por la ruta de Sty1 y, en el caso de *ctt1*, también por el factor de transcripción Pap1.

La ruta de la quinasa Sty1 también regula parcialmente la expresión de los genes *tps1* y *ntp1*, responsables de la producción de la trehalosa, en respuesta a estrés salino. Esta regulación transcripcional es Atf1/Pcr1 dependiente. Además, la actividad quinasa de Sty1 se ve implicada en la activación post-traduccional de la enzima trehalasa (Ntp1) y en el incremento del contenido de trehalosa frente a ese tipo de estrés, en este caso de forma Atf1/Pcr1-independiente (Madrid et al., 2004).

Finalmente, otro gen importante en la reprogramación de la expresión génica frente a un estrés osmótico, es el que codifica para la proteína Gcn5, involucrada en la acetilación de las histonas y remodelación de la cromatina. Los genes inducidos por este coactivador son sólo un subgrupo de todos los que se expresan en respuesta a un estrés osmótico y la mayoría han resultado ser genes CESR, hecho que relaciona la ruta de la MAPK Sty1, que regula la transcripción de la mayoría de los genes CESR, con la actividad de Gcn5. De hecho, más de la mitad de los genes regulados por el coactivador presentan un dominio para la unión al factor de transcripción Atf1 (Johnsson et al., 2006).

### 2.2.5 Respuesta a falta de glucosa

La respuesta frente a falta de glucosa es regulada principalmente por las rutas de Sty1 y Pka1, que actúan de forma antagonista. En presencia de glucosa, la alta concentración de cAMP permite la activación de la quinasa Pka1 y la consecuente represión de genes de respuesta a estrés y del metabolismo de la gluconeogénesis. Frente a un estrés por falta de glucosa ocurren dos eventos: por un lado la bajada de cAMP inactiva la ruta de Pka1, y a al mismo tiempo se activa la respuesta regulada por la quinasa Sty1 (Shiozaki et al., 1997; Stettler et al., 1996). La mayoría de los genes dereprimidos por la inactivación de Pka1 son, a la vez, los genes activados por la ruta de Sty1. La falta de glucosa obliga a las células a entrar en la condición definida como fase estacionaria: este proceso será descrito más en detalle a continuación. En este apartado se describe la regulación del gen *fbp1*, necesario para activar la gluconeogénesis y compensar así la falta de glucosa en el medio.

El gen *fbp1* contiene en su región promotora dos regiones UAS (Upstream Activation Site), UAS1 y UAS2, necesarias para la activación del mismo. Ambas regiones están reguladas por las quinasas Sty1 y Pka1 pero los mecanismos son distintos para cada región.

UAS1 contiene una secuencia consenso CRE (cAMP response element) a la que se une el heterodímero Atf1/Pcr1 en condiciones de falta de glucosa. Si las células tienen inactivada la ruta de Pka1 esta unión ocurre también en presencia de glucosa mientras que, con escasez de glucosa, la unión se promueve gracias a la activación de la ruta de Sty1. En células donde Pka1 es activa por una mutación de su subunidad reguladora Cgs1, la activación de Sty1 permite igualmente la unión a la secuencia CRE, pero la expresión de *fbp1* está disminuida. La variedad de combinaciones posibles entre la activación o inactivación de las dos rutas de Sty1 y Pka1 y la capacidad de Atf1/Pcr1 de unirse o no a la secuencia CRE demuestran que la expresión de *fbp1* tiene múltiples grados de regulación (Neely and Hoffman, 2000).

A la región UAS2 se unen por lo menos cuatro distintos complejos proteicos, lo que demuestra una vez más la complejidad de la expresión génica de *fbp1*. Cada uno de los complejos se une o no a la región UAS2 dependiendo de las condiciones del medio y de la actividad de las rutas de Pka1 y Sty1. Por norma general, Pka1 regula de forma negativa la región UAS2 estimulando la actividad de represores o inhibiendo proteínas activadoras, mientras que Sty1 regula positivamente la expresión de activadores. En esta segunda región Atf1 no se une directamente al promotor pero su presencia influye de forma positiva sobre la unión de otros activadores. En este tramo del promotor se encuentra la secuencia STRE específica para la unión del factor de transcripción Rst2, citado anteriormente (Higuchi et al., 2002).

Otras dos proteínas que juegan un papel en la expresión de *fbp1* son los corepresores Tup11 y Tup12, homólogos a Tup1 en *S. cerevisiae*. Estas dos proteínas son reguladores negativos redundantes y se unen a una amplia región entre UAS1 y UAS2 (Janoo et al., 2001).

Un estudio reciente ha demostrado que durante la transcripción del gen *fbp1* se producen, además del transcrito que codifica para la proteína, transcritos de mayor longitud que no codifican para ningún péptido. Estos transcritos son de vital importancia para la expresión del enzima porque la RNA polimerasa II necesita transcribir estas regiones para permitir la remodelación de la cromatina y la derrepresión transcripcional del gen *fbp1* (Hirota et al., 2008). En el modelo propuesto por estos investigadores, la transcripción de *fbp1* en presencia de glucosa es inhibida por la función represiva de las proteínas Tup 11 y 12. En ausencia de glucosa, en primer lugar Atf1 se une a la región UAS1 permitiendo a la RNA polimerasa II de iniciar la síntesis de los RNA no codificantes. Esto provoca una reacción en cadena que permite en primer lugar la unión de Rst2 a la región UAS2 y, seguidamente, la modificación de la cromatina en la región "TATA box" para activar la transcripción del mensajero codificante Fbp1.

### 2.2.6 Respuesta a falta de nitrógeno

*S. pombe* es un organismo haploide que en condiciones favorables crece mediante un ciclo mitótico pero la falta de nutrientes, especialmente la de nitrógeno, induce su reproducción sexual (Egel, 2000). El primer paso es la conjugación de dos células de sexo opuesto, h+ y h-. Una célula h+ y una h- deben reconocerse, acercarse y finalmente fusionarse: eso ocurre mediante el sistema de comunicación de las feromonas que permite la conjugación de las dos células. Este proceso, también conocido como "mating", producirá un cigoto, con un contenido de DNA de 2C, que puede crecer con un ciclo mitótico diploide si las condiciones nutricionales mejoran en este punto del proceso, pero suelen ser muy inestables y suelen entrar rápidamente en meiosis si los niveles nutricionales siguen bajos. En primer lugar se producirá un bloqueo transitorio en G1 y seguidamente la replicación del DNA durante la fase S meiótica. A continuación tienen lugar dos divisiones nucleares consecutivas, meiosis I y meiosis II, y finalmente la esporulación. La meiosis culminará con la formación de un asco con cuatro esporas en su interior. Las esporas son la forma de resistencia que permitirá sobrevivir a las condiciones adversas y germinar cuando el entorno vuelva a ser favorable (Yamamoto et al., 1997).

La reproducción sexual frente a falta de nitrógeno es posible solamente si la población celular contiene células de ambos sexos. En caso contrario, las células se quedan en un estadio de latencia hasta que las condiciones ambientales mejoren. Este estadio se puede considerar como una fase estacionaria inducida por falta de nitrógeno, aunque normalmente se define como fase estacionaria la que es causada por falta de glucosa. Una diferencia sustancial entre las dos condiciones es que la falta de nitrógeno induce una parada de las células en G1, mientras que la ausencia de glucosa bloquea las células en la fase G2 del ciclo celular.

La detección de falta de nitrógeno en el medio tiene como efectos en la célula la parada del ciclo en G1 y la inducción del factor de

transcripción Ste11, necesario para empezar el programa de comunicación de las feromonas y para la entrada en meiosis. Células  $\Delta ste11$  son estériles y esporulan incorrectamente pero no tienen ningún defecto en el ciclo mitótico. La sobreexpresión de Ste11 produce la entrada en meiosis de forma ectópica, incluso en medio rico en nutrientes (Sugimoto et al., 1991). Uno de los genes regulados por Ste11 es *mei2*, que codifica para un activador esencial para la replicación premeiotica del DNA (Shimoda et al., 1985; Watanabe and Yamamoto, 1994).

Las tres principales vías encargadas de señalar la falta de nutrientes, rutas Pka1, Sty1 Y TOR, se ven involucradas en detectar la falta de nitrógeno.

Como para la regulación de *fbp1*, también para *ste11* la ruta de Pka1 y Sty1 actúan de forma antagonista (Dal Santo et al., 1996; Kanoh et al., 1996; Stettler et al., 1996; Takeda et al., 1995). La ruta de Pka1 controla la expresión de este gen inhibiendo la activación del factor de transcripción Rst2 que, en su estado activo, se une a una secuencia STRE del promotor de *ste11* activando su transcripción. Células mutadas en el gen *rst2* tienen baja expresión de Ste11 y son estériles (Kunitomo et al., 2000). Al contrario, la activación de la ruta de Sty1 por falta de nitrógeno promueve la transcripción de *ste11* de forma Atf1-dependiente, aunque la interacción directa del factor de transcripción no se ha demostrado (Takeda et al., 1995).

#### 2.2.6.1 TOR

Otra vía muy importante en sensor la falta de nitrógeno en levadura es la de la quinasa TOR. Esta quinasa se aisló por su sensibilidad a rapamicina pero, contrariamente a lo que ocurre en mamíferos y en la levadura *S. cerevisiae*, en *S. pombe* este antibiótico no inhibe el crecimiento celular ni la entrada en fase estacionaria ni el bloqueo en fase G1 del ciclo pero sí actúa negativamente sobre la normal conjugación entre células en condiciones de escasez de nutrientes (Weisman et al., 1997) y sobre la entrada (uptake) de aminoácidos, sobre todo leucina

(Weisman et al., 2005). Igual que ocurre en *S. cerevisiae*, también en *S. pombe* hay dos genes que codifican para la quinasa TOR: *tor1* y *tor2*. El homólogo de *TOR1* de *S. cerevisiae* es *tor2* de *S. pombe* y el de *TOR2* es *tor1*. El complejo TORC1 en *S. pombe* contiene la quinasa Tor2 mientras que TORC2 contiene Tor1.

*tor1* no es un gen esencial, pero su delección inhibe la capacidad de las células de parar en G1 y conjugar frente a falta de nitrógeno, hace las células estériles, fenotípicamente más alargadas e incapaces de responder a diferentes tipos de estrés y de sobrevivir en fase estacionaria (Kawai et al., 2001; Weisman and Choder, 2001). Otra función de Tor1 es la regulación del importe de leucina. Como hemos dicho anteriormente, ambos procesos son inhibidos por rapamicina y pueden ser rescatados usando un gen *tor1* que no tenga zona de unión para el antibiótico (Weisman et al., 1997; Weisman et al., 2005). Recientemente se ha propuesto que ambas quinasas Tor regulan la entrada de aminoácidos: Tor1 de forma positiva mientras que Tor2 de forma negativa (Weisman et al., 2007).

Contrariamente a lo que ocurre con el gen *tor1*, *tor2* es esencial (Kawai et al., 2001; Weisman and Choder, 2001). Mutantes temperatura sensibles de este gen muestran, a temperatura restrictiva, una parada del ciclo celular en G1, conjugación y expresión de genes de respuesta a falta de nitrógeno, pero no de glucosa, también en presencia de nutrientes. En el caso contrario, la sobreexpresión de Tor2 reprime la eficiencia de conjugación y esporulación (Alvarez and Moreno, 2006; Matsuo et al., 2007; Uritani et al., 2006). Tor2 se ha visto implicado en la regulación de Ste11 y Mei2. Alvarez y Moreno han caracterizado la existencia de complejos que contienen Tor2, Ste11 y Mei2 (Alvarez and Moreno, 2006). Además, estudios de microarrays establecen que Tor2 regula negativamente la expresión de Ste11 y Mei2 (Matsuo et al., 2007).

Tor2 tiene también un papel en la regulación del crecimiento celular porque promueve la transcripción de genes para proteínas ribosomales (Alvarez and Moreno, 2006).

Recientemente, Petersen y Nurse han descubierto que, en caso de crecimiento en glutamato, la rapamicina es capaz de inhibir Tor2 y tiene los mismos efectos que la falta de nitrógeno. En esta publicación por primera vez se describe que ambas quinasas Tor son inhibidas por rapamicina en *S. pombe*. En este trabajo se relaciona la ruta de TOR con la ruta de la MAP quinasa Sty1: frente a bajada de nutrientes la ruta TOR se inhibe activando a Gcn2, un regulador traduccional que regula negativamente Pyp2. La bajada de los niveles de Pyp2 permite la activación de Sty1 y la consecuente fosforilación de Cdc2 que permite acelerar el proceso de mitosis con un tamaño celular más pequeño respecto a la mitosis en presencia de nutrientes (Petersen and Nurse, 2007).

Contrariamente a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en *S. pombe* no se ha encontrado una implicación de las quinasas Tor1 y Tor2 en la organización de la actina.

### **3 FASE ESTACIONARIA: UN TIPO DE ESTRÉS AMBIENTAL**

Otra condición que se considera de estrés para las células y que activa, como respuesta, un programa reversible de expresión génica e incluso un cambio morfológico es la falta de nutrientes. Cuando las células se encuentran en este estado se consideran en "fase estacionaria", condición definida como una de las etapas características de un cultivo microbiano.

#### **3.1 Perfil de la curva de crecimiento de cultivos microbianos**

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, éstos comienzan a multiplicarse a expensas de los nutrientes hasta que, finalmente, el crecimiento se detiene por agotamiento de alguno de los componentes del medio de cultivo (sustrato limitante) o bien por acumulación de inhibidores.

La evolución del cultivo en el tiempo sigue una curva típica en la que se pueden diferenciar perfectamente cuatro fases. En primer lugar existe una fase donde prácticamente no hay división celular pero sí aumento de la masa individual de los microorganismos (fase "lag" o fase de transición). Le sigue una etapa donde el crecimiento ocurre a una velocidad específica, máxima y constante (fase logarítmica o exponencial). Al final de esta fase se alcanza la máxima concentración microbiana. Posteriormente hay un rápido período de desaceleración, y se entra en la fase estacionaria la cual es causada por agotamiento de algún nutriente (el sustrato limitante) o bien por acumulación de inhibidores. Durante esta fase la concentración microbiana (o de biomasa) permanece constante. Finalmente se llega a una última etapa donde la concentración de biomasa disminuye por autólisis o como consecuencia del metabolismo endógeno (fase de decaimiento). La duración de cada una de estas fases es función del microorganismo en estudio y de la composición del medio de cultivo.

El sustrato limitante de un cultivo que alcanza la fase estacionaria puede ser distinto: carbono, nitrógeno, azufre o fósforo como ejemplos.

Muchos estudios afirman que hay una respuesta común, sin depender de cuál sea el factor limitante, pero otros autores definen como fase estacionaria solamente la que es provocada por una falta de carbono (Herman, 2002).

### 3.2 Cambios en respuesta a la entrada en fase estacionaria

Como se ha indicado anteriormente, las células que entran en fase estacionaria se encuentran en una condición de estrés a la que responden provocando principalmente dos cambios: uno en la expresión génica y uno morfológico, con el objetivo de sobrevivir a prolongados periodos de escasez. Consecuentemente a esa respuesta las células se hacen más resistentes a diferentes tipos de estrés medioambiental y permanecen metabólicamente activas para crecer rápidamente en el momento en que las condiciones lo permitieran. La mayoría de estos cambios son comunes a la respuesta a otros tipos de estrés aunque se encuentre, también, la expresión de genes y la producción de proteínas específicas para esta condición.

Las características más comunes de una célula en fase estacionaria son una morfología más compacta y esférica, una pared más resistente, la acumulación de glicógeno y trehalosa, un aumento de la resistencia frente a estrés osmótico, oxidativo y térmico, la condensación de los cromosomas, además de una reorganización de la maquinaria transcripcional y traduccional.

Como en todo tipo de estrés, también para la respuesta a fase estacionaria hay características específicas para cada organismo; a continuación se describe la respuesta en *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

#### 3.2.1 Fase estacionaria en bacterias: *E. coli* como modelo

La respuesta a fase estacionaria en bacterias se activa de forma diferente a las descritas para las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* debido a que, además de la falta de nutrientes, juega un papel importante

la densidad del cultivo celular y la consecuente producción de señales químicas, como se describe más adelante.

Al igual que ocurre en levaduras, al llegar a fase estacionaria se activa en bacteria un programa reversible de expresión génica que reduce la expresión de genes de crecimiento y activa los de adaptación, con el objetivo de sobrevivir a largos periodos de escasez y mantener la actividad metabólica para reiniciar el crecimiento una vez vuelva a haber nutrientes.

#### 3.2.1.1 Mutantes GASP

En la mayoría de células bacterianas, en condición de fase estacionaria avanzada se han descrito alteraciones genéticas llamadas GASP (growth advantage in stationary phase) capaces de conferir un fenotipo de resistencia a la falta de nutrientes. Generalmente el resultado de estas mutaciones es evidente en una fase estacionaria a largo plazo, alrededor de diez días, y caracteriza las células por ser más resistentes a este tipo de estrés en comparación con células más jóvenes que todavía no han desarrollado GASPs.

Hoy en día se han hallado diferentes mutaciones GASP capaces de conferir esta ventaja para la célula. En *E. coli* hay tres lugares de mutación bien caracterizados; el ejemplo más común es el gen *rpoS*, que codifica para el factor sigma s ( $\sigma^s$ ): mutaciones en este gen provocan una desregulación de este factor que puede producir diferentes ventajas adaptativas, mientras que la pérdida funcional completa de este gen causa sensibilidad a estreses ambientales y a la fase estacionaria, además de falta de cambios morfológicos típicos de la respuesta a esta última (Goodrich-Blair et al., 1996).

Además se han descrito mutaciones en el gen *lpr*, regulador de síntesis de aminoácidos, regulado por leucina, y en el cluster *ybeJ-gltJKL* que codifica para un transportador de alta afinidad para aspartato y glutamato (Finkel, 2006).

### 3.2.1.2 Regulación del cambio en la expresión génica

Al entrar en fase estacionaria, *E. coli* sufre cambios a nivel estructural y funcional del DNA, de la maquinaria de transcripción y la de traducción.

Las proteínas con unión a DNA Fis, HU y Hfq son remplazadas por una única proteína Dps, con la misma función, pero específica para fase estacionaria; esto da lugar a una compactación del DNA y al silenciamiento de muchos genes.

A nivel transcripcional, la subunidad sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ), que reconoce las regiones de los promotores, es sustituida por la subunidad sigma s ( $\sigma^s$ ). Este proceso es regulado por la proteína Rsd que cataliza el cambio y almacena  $\sigma^{70}$ ; además, variaciones en la composición citoplasmática favorecen el acoplamiento del holoenzima con  $\sigma^s$  más que con  $\sigma^{70}$ . Estos cambios favorecen la transcripción de genes específicos de fase estacionaria.

Finalmente, a nivel de la maquinaria de traducción, el cambio más relevante es la dimerización de los monómeros 70S que pasan a ser dímeros inactivos 100S. Este proceso es llevado a cabo por la proteína RMF, cuya delección es letal para la célula en fase estacionaria, lo que hace deducir que la dimerización de los ribosomas es esencial para la respuesta frente a esta condición (Ishihama, 1999).

### 3.2.1.3 Perfil de la expresión génica en fase estacionaria

Al entrar en fase estacionaria tiene lugar una disminución general de la expresión génica. La mayoría de los genes importantes para mantener a las células dividiéndose activamente disminuyen su transcripción y aumentan la de un conjunto de aproximadamente 250 genes que codifican para funciones que mantienen la viabilidad de las células en condiciones de escasez. Este cambio en el patrón de transcripción de la célula depende principalmente del reemplazo del factor de transcripción  $\sigma^{70}$  en la enzima RNA polimerasa por  $\sigma^s$ . El factor  $\sigma^{70}$  media la transcripción de la mayoría de los genes importantes para un crecimiento

activo, mientras que  $\sigma^s$  es un regulador que incrementa su actividad en respuesta al estrés nutricional y a otras condiciones como el daño al DNA, el choque osmótico y la disminución del pH. Aún así, podemos clasificar los genes específicos de fase estacionaria como independientes o dependientes del factor  $\sigma^s$ .

Pertencen a los independientes algunos genes que parecen encargados de que la célula pueda sobrevivir en condición de escasez, como genes inducidos por el aumento de cAMP (para la síntesis de glicógeno o para la utilización de péptidos como fuente de carbono y energía) o genes inducidos por el activador transcripcional OmpR (Hernandez-Chico et al., 1986; Romeo and Preiss, 1989; Schultz and Matin, 1991).

Los genes controlados transcripcionalmente por el factor  $\sigma^s$ , en cambio, son la mayoría y su regulación es extremadamente sofisticada; variaciones en las condiciones en la que se produce la reacción de transcripción (a nivel de diferencias en la cantidad RNA/promotor) o en la topología del DNA, pueden cambiar la capacidad de reconocer el promotor y la eficiencia de la transcripción.

Se pueden dividir los genes regulados por  $\sigma^s$  en dos grupos: los genes regulados directamente por  $\sigma^s$  (ej. *csiD*, para estrés térmico, *otsBA*, para la producción de trehalosa, *dps*, para la respuesta a daño oxidativo, *katE*, para la respuesta a daño oxidativo (catalasa HPII), *xthA*, para reparar daños al DNA (exonucleasa III)) o genes regulados por otros reguladores transcripcionales controlados por  $\sigma^s$  (ej. *bolA*, activador transcripcional de genes implicados en la división celular, *appY*, regula la transcripción de *cyxAB* (citocromo oxidasa) y *appA* (fosfatasa acida) para el metabolismo anaeróbico) (Goodrich-Blair et al. 1996).

#### 3.2.1.4 “Quorum sensing” como señal de fase estacionaria

Las células bacterianas, en respuesta a fase estacionaria, activan la producción de unas moléculas que funcionan como señal química, llamadas “autoinducer”, que perciben y responden a fluctuaciones en la

densidad de la población celular. La presencia de “autoinducer” permite la comunicación intercelular, además de alterar la expresión génica para adaptarse a las nuevas condiciones; este fenómeno se describe como “quorum sensing”.

Bacterias gram negativo y gram positivo regulan diferentes actividades fisiológicas en respuesta a “quorum sensing”, los primeros produciendo como “autoinducer” homoserin-lactona acilada, un metabolito derivado de la síntesis de aminoácidos, los segundos produciendo oligopéptidos o dipéptidos cíclicos. Los procesos modificados por la activación del mecanismo “quorum sensing” incluyen, entre otros, capacidad de causar virulencia, producir bioluminiscencia o antibióticos, formación de biofilm, o aumento de la competencia (de Kievit and Iglewski, 2000; Miller and Bassler, 2001).

### 3.2.2 Fase estacionaria en *S. cerevisiae*

La entrada en fase estacionaria de distintas levaduras, como pueden ser *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *Candida albicans*, puede presentar numerosas diferencias, empezando por los perfiles de los cultivos.

#### 3.2.2.1 Perfil de crecimiento de *S. cerevisiae*

El crecimiento en glucosa es el perfil mejor caracterizado para un cultivo de *S. cerevisiae*. Durante la fase logarítmica, donde hay abundancia de nutrientes, las células crecen y se dividen, utilizando la fermentación como mecanismo de producción de energía. Cuando la glucosa empieza a ser limitante el crecimiento se para momentáneamente y la células dejan de fermentar para respirar; este periodo de transición es llamado “shift diauxico”; en la fase que sigue al shift diauxico las células crecen despacio y respiran el etanol, producido durante la fermentación, como fuente de carbono. Finalmente, cuando el etanol se agota, se entra en la fase estacionaria donde no hay incremento del número de células.

Las características finales de una célula en fase estacionaria se pueden considerar el resultado de los cambios ocurridos durante el shift diauxico y la entrada en fase estacionaria.

### 3.2.2.2 Rutas que regulan la fase estacionaria en *S. cerevisiae*

La entrada en fase estacionaria es regulada por diferentes rutas: las principales son las rutas de las quinasas TOR y PKA como reguladores negativos y las rutas PKC y AMPK como reguladores positivos de la transición hacia esta condición.

La quinasa TOR se encuentra en dos complejos distintos: TORC1, que regula el crecimiento celular actuando sobre la síntesis de proteínas y el metabolismo, y TORC2 que regula principalmente la organización del citoesqueleto de actina. Solamente el complejo TORC1 parece ser regulado por el nivel de nutrientes y es el único de los dos que se inhibe por tratamiento con rapamicina (Dechant and Peter, 2008). La quinasa TOR, activada principalmente por falta de nitrógeno, actúa regulando un complejo sistema de quinasas y fosfatasas: así por ejemplo, en presencia de nutrientes, se activa y promueve la unión de la proteína Tap42 con la subunidad catalítica PP2A de diferentes fosfatasas como Sit4, Pph21 y Pph22. Tanto el tratamiento con rapamicina como el “shift diauxico” regulan negativamente la función de TOR y promueven la disociación de estos dos elementos, causando un aumento de la transcripción de genes que responden a falta de nitrógeno y glucosa y genes para la activación del ciclo de Krebs. La inhibición de TOR promueve además, de forma independiente de la proteína Tap42, una disminución en la expresión de genes para proteínas ribosomales y componentes del aparato de transcripción y la activación de los factores de transcripción Msn2/Msn4, también regulados negativamente por la ruta PKA.

La regulación negativa de TOR afecta también a la ruta PKC, que controla la integridad celular regulando la biosíntesis de la pared y del citoesqueleto de actina. Esta ruta también se activa frente a la entrada en

fase estacionaria, aún sin ser un sensor de nutrientes, para reforzar la pared celular y permitir la viabilidad de las células (Gray et al., 2004).

Aunque se conozcan muchos efectos de la regulación de esta ruta, sólo recientemente se ha caracterizado la primera proteína directamente regulada por fosforilación por parte de TOR, la quinasa Sch9, que regula la biosíntesis de ribosomas, el control del tamaño celular y la entrada en fase estacionaria (Dechant and Peter, 2008; Urban et al., 2007). Una de las proteínas reguladas negativamente por Sch9, así como por TOR de forma Sch9 independiente, es la quinasa Rim15. Esta proteína, activada por falta de nutrientes, regula la expresión de genes necesarios para parar el ciclo celular en fase estacionaria y genes de respuesta a estrés a través de los factores de transcripción Msn2/Msn4 y Gis1 (Wei et al., 2008).

La ruta PKA también actúa como inhibidor de la entrada en fase estacionaria. Como hemos dicho anteriormente (apartado 2.1.2), la levadura *S. cerevisiae* tiene tres subunidades catalíticas de la quinasa A, codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*, cada una de las cuales tiene especificidad para transcribir determinados genes: así, por ejemplo, la quinasa Tpk2 regula negativamente la entrada de hierro y positivamente la degradación de trehalosa, mientras que la Tpk1 es necesaria para derreprimir la transcripción de genes necesarios para la biosíntesis de determinados aminoácidos (Robertson et al., 2000). La mayoría de las diana de la ruta PKA son comunes a la ruta TOR: se ha descrito una regulación negativa de la quinasa Rim15 y de los factores de transcripción Msn2/Msn4. Otro complejo controlado por PKA y que contribuye en la represión de los factores de transcripción Msn2/Msn4 es el complejo Ccr4-Not, que regula positivamente o negativamente la expresión genes a través del factor TFIID (Lenssen et al., 2002).

Finalmente, la ruta de la quinasa Snf1, homologa a la quinasa AMPK de mamífero, regula la entrada en fase estacionaria de forma positiva. En presencia de glucosa la proteína Snf1 es inactiva pero deja de serlo muy rápidamente cuando el nutriente se agota. En esta condición Snf1 activa los genes necesarios para el uso de fuentes de carbono alternativas y de

rutas metabólicas que generen ATP. Así, mutante en *SNF1* no pueden utilizar etanol o glicerol como fuentes de carbono y mueren cuando el cultivo entra en fase estacionaria (Gray et al., 2004).

### 3.2.2.3 Regulación de transcripción y traducción

En *S. cerevisiae*, el perfil de la expresión génica debido a fase estacionaria por falta de glucosa se puede dividir en dos etapas. Primariamente se activa la respuesta al shift diauxico con la expresión de genes importantes para la respiración, el metabolismo de los ácidos grasos, el ciclo de glioxalato y numerosos genes de respuesta a estrés. La mayoría de estos genes sigue expresada después del shift diauxico aunque una parte se inhibe al entrar en la fase estacionaria. En esta segunda fase hay la inhibición de genes necesarios para el crecimiento y la división celular, genes para síntesis de membrana y pared, metabolismo de aminoácidos y progresión del ciclo celular, y la expresión de genes específicos de la fase estacionaria tardía, importantes para la supervivencia en esta condición, como *SNZ1* (Gasch et al., 2000; Gasch and Werner-Washburne, 2002).

A nivel de traducción, la síntesis de proteínas sigue activa en fase estacionaria, aunque a un 0,3% de su nivel en fase exponencial. La variedad de proteínas sintetizadas en esta condición es similar a la de la fase logarítmica y algunas se llegan a transcribir incluso cuatro semanas después de la entrada en fase estacionaria (Fuge et al., 1994). Mantener activa la traducción en esta condición es fundamental para la supervivencia, como confirma la pérdida de viabilidad en fase estacionaria de cultivos en presencia de cicloheximida (Granot and Snyder, 1993).

### 3.2.3 Fase estacionaria en *S. pombe*

Los estudios sobre fase estacionaria en la levadura de fisión son escasos respecto a la mucha información que encontramos para la levadura *S. cerevisiae*, que siempre ha sido una base de partida muy

importante para enfocar los estudios en *S. pombe*. No obstante la similitud entre estas dos especies, es importante recordar que hay diferencias sustanciales: el ciclo celular, la respuesta a estrés y el perfil de crecimiento son probablemente los aspectos en que más difieren.

#### 3.2.3.1 Perfil de crecimiento de *S. pombe*

La fuente de carbono utilizada principalmente por *S. pombe* es la glucosa. Durante la fase logarítmica las células se dividen mitóticamente y crecen de forma exponencial consumiendo los nutrientes. Cuando la glucosa empieza a ser limitante las células dejan de fermentar para respirar pero, contrariamente a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, *S. pombe* no hace shift diauxico y no es capaz entonces de respirar el etanol producido durante la fermentación porque su metabolismo no incluye el ciclo del glioxalato, indispensable para esta función (de Jong-Gubbels et al., 1996). Cuando no queda glucosa en el medio las células dejan de dividirse y entran en fase estacionaria, adquiriendo las características morfológicas típicas de esta condición y la capacidad de sobrevivir en un estadio latente durante mucho tiempo.

#### 3.2.3.2 Metabolismo de utilización de los azúcares en *S. pombe*

Uno de los aspectos importantes para el metabolismo de los azúcares es su internalización. En *S. pombe* se ha caracterizado una familia de transportadores de hexosas compuesta por seis proteínas diferentes: Ght1 hasta Ght6 (Heiland et al., 2000). Ght5 es el transportador más abundante y se ha descrito que Ght1, Ght2 y Ght5 muestran una afinidad mucho mayor por glucosa que por fructosa.

Como hemos dicho anteriormente, el azúcar preferiblemente utilizado por *S. pombe* es la glucosa. La presencia de alta concentraciones de glucosa reprime la transcripción de genes que codifican para enzimas necesarios para la utilización de fuentes alternativas de carbono. Este efecto se describe como “represión catabólica” (Flores et al., 2000). En

presencia de abundante glucosa, *S. pombe* fermenta en vez de respirar, aunque las condiciones sean aeróbicas: este efecto se describe como “efecto Crabtree”. Las levaduras se pueden clasificar como capaces o no de hacer colonias “petite” frente a tratamiento con acriflavina y otros tratamientos que reducen la eficiencia de respiración (Bulder, 1964a). Si se producen las colonias hablamos de una levadura “petite positiva”, como en el caso de *S. cerevisiae*, en caso contrario “petite negativa”, como en el caso de *S. rosei*. Las levaduras “petite negativas” no son capaces de crecer en condiciones anaeróbicas (Bulder, 1964b) y no sufren efecto “Crabtree” (De Deken, 1966). Inicialmente se clasificó *S. pombe* como una levadura “petite negativa”, pero se demostró pronto que esta levadura sí es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas y sufre represión por glucosa de los enzimas de la respiración (Heslot et al., 1970; Poole and Lloyd, 1973).

Solamente en condición de falta de glucosa *S. pombe* puede utilizar gluconato como fuente de carbono. Uno de los transportadores implicado en el transporte de este azúcar es Ght3. La activación del proceso de importe es regulado paralelamente por dos rutas: la ruta de Sty1 actúa de forma positiva mientras que la ruta de Pka1 lo hace de forma negativa. La inhibición del importe es glucosa-dependiente: la presencia del azúcar juntamente a la formación de cAMP reprimen el importe de gluconato de forma muy rápida y reversible. Contrariamente al proceso de activación, en el caso de la represión del importe de gluconato no es importante la presencia de la quinasa Pka1, pero sí de la adenilato ciclasa para la producción de cAMP (Caspari AND Urlinger 1996; Caspari 1997). La búsqueda de mutantes incapaces de importar gluconato ha permitido caracterizar la proteína Gti1 que, sin ser un transportador de gluconato, es importante para promover esta actividad. La sobreexpresión de *gti1* es capaz de rescatar la falta de importe de gluconato defectuosa en la ruta de Sty1: aún está por averiguar si la ruta de la MAP quinasa activa la expresión de *gti1* o estimula su actividad (Caspari 1997).

Otro azúcar que puede ser utilizado por *S. pombe* como única fuente de carbono es la  $\delta$ -gluconolactona; para metabolizarlo las células utilizan

el ciclo de las pentosas fosfato, una ruta que permite producir NADPH y ribosa-5-fosfato. La actividad de los enzimas de la ruta de las pentosas fosfato es inhibida por glucosa (Mehta et al., 1998).

Finalmente, *S. pombe* es capaz de utilizar glicerol como fuente de carbono. Los enzimas que catalizan la fosforilación y la consecuente oxidación del glicerol para formar dihidroxiacetona fosfato (DHAP) son diferentes en *S. cerevisiae* y en *S. pombe*: mientras en el primer caso los enzimas interesados son la glicerol quinasa y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, en *S. pombe* actúan una glicerol deshidrogenasa NAD-dependiente y una dihidroxiacetona quinasa, respectivamente (Gancedo et al., 1986). El producto de este proceso, la dihidroxiacetona fosfato, puede ser utilizado como precursor de la gluconeogénesis o como intermediario en la glicólisis.

### 3.2.3.3 Rutas que regulan la fase estacionaria en *S. pombe*

Como hemos descrito anteriormente, las principales rutas que responden a escasez de nutrientes, en particular glucosa, son las rutas de Sty1 y Pka1, que permiten la adaptación a la fase estacionaria gracias a la activación de genes de respuesta como puede ser *fbp1*, necesario para el proceso de gluconeogénesis (Dal Santo et al., 1996; Stettler et al., 1996; Takeda et al., 1995).

La respuesta a estrés por fase estacionaria se ve afectada en mutantes de la ruta de Sty1 porque este tipo de células no son capaces de activar la parada del ciclo celular ni de adquirir el fenotipo típico de las células quiescentes y la viabilidad en esta condición es mucho más corta que la de una cepa salvaje (Kato et al., 1996). Por el contrario, una cepa delecionada en el gen de la quinasa Pka1 sigue manteniendo la capacidad de adaptarse a esta condición de estrés, incluso de forma más eficaz que una cepa salvaje; las células, una vez adquirido el estado estacionario, sobreviven durante un tiempo más largo y resisten mejor a estrés oxidativo (Roux et al., 2006). Células que tienen constitutivamente

activada la ruta de Pka1, como mutantes en la subunidad reguladora Cgs1 o en la fosfodiesterasa Cgs2, en cambio, pierden viabilidad al alcanzar la fase estacionaria (DeVoti et al., 1991).

Otra proteína que es indispensable para la viabilidad específicamente frente a falta de glucosa es Rsv1. Células que carecen de esta proteína presentan un crecimiento normal y pueden conjugarse y esporular normalmente. En fase estacionaria el aspecto de células delecionadas en *rsv1* no presentan diferencias con respecto a células salvajes, la pared se hace igual de gruesa y se acumula igual cantidad de trehalosa. Contrariamente a las células salvajes, células defectuosas en Rsv1 son menos resistentes a estrés por calor en fase estacionaria, signo de que la adaptación a esta condición no es completa o de que la falta de Rsv1 crea un defecto metabólico. La expresión de Rsv1 aumenta veinte veces al entrar en fase estacionaria por falta de glucosa y esta expresión es independiente de la ruta de Sty1 pero es regulada negativamente por la ruta de Pka1. La expresión ectópica de *rsv1* es capaz de rescatar la falta de viabilidad de células defectuosas en la enzima fosfodiesterasa (Cgs2) y en la subunidad reguladora de la quinasa Pka1 (Cgs1) (Hao et al., 1997). Estudios recientes han determinado que Rsv1 actúa como represor transcripcional de genes del metabolismo de la glucosa durante el proceso de meiosis (Mata et al., 2007).

Otras publicaciones han descrito otros genes cuya deleción afecta a la entrada o a la duración de la viabilidad frente a fase estacionaria. Entre estos se hallan genes para la síntesis de triacilglicérols (genes *dga1* y *plh1*) (Zhang et al., 2003), genes para la utilización de los ácidos grasos (genes *lcf1* y *lcf2*) (Fujita et al., 2007; Oshiro et al., 2003), o la familia de genes Ecl (Ohtsuka et al., 2008; Ohtsuka et al., 2009).

La ruta de TOR, responsable principalmente de la respuesta frente a falta de nitrógeno, también muestra fenotipo frente a falta de glucosa porque un mutante *tor1* tiene viabilidad más corta respecto a una cepa salvaje (Weisman and Choder, 2001). Además *sck2*, homólogo al gen de la ruta de TOR *SCH9* de *S. cerevisiae*, tiene fenotipo parecido a un mutante *pka1* frente a fase estacionaria, aunque con menos capacidad de

adaptación a estrés oxidativo o por calor. El doble mutante *pka1-sck2* muestra una viabilidad aún más alargada y una mayor resistencia a estrés respecto a los mutantes individuales (Roux et al., 2006).

#### 3.2.3.4 Perfil de la expresión génica en fase estacionaria

Aunque se haya descrito el aumento de la expresión de genes para la gluconeogénesis y enzimas para la respiración frente a falta de glucosa, en *S. pombe* no existe un estudio global de transcripción frente a fase estacionaria por falta de glucosa.

Células que entran en fase estacionaria por falta de glucosa y por falta de nitrógeno tienen una parada en dos momentos diferentes del ciclo celular y con una cantidad de DNA nuclear (N) distinta, fase G2 (2N) o G1 (1N) respectivamente, pero la viabilidad y las características de las células después de la parada del ciclo se pueden considerar las mismas (Costello et al., 1986). Por esta razón, un estudio reciente de mutantes de *S. pombe* necesarios para la entrada y el mantenimiento de la fase estacionaria por falta de nitrógeno, llevado a cabo por el grupo de Yanagida, puede servir para tener un cuadro general de las funciones celulares necesarias para adaptarse a la condición de quiescencia (Sajiki et al., 2009). En este estudio la MAP quinasa quinasa Wis1 y la quinasa Sty1 fueron aisladas como proteínas necesarias para parar el ciclo celular y adquirir las características fenotípicas de las células quiescentes. Se identificaron otros genes relacionados con funciones celulares involucradas en la respuesta a la falta de nitrógeno: genes para la formación de endosomas (genes *wsp1* y *end4*), la remodelación de cromatina (genes *mis4* y *mis16*), el metabolismo del ATP (genes *pyk1* y *cts1*), el tráfico intracelular de proteínas (genes *ypt1*, *apl2*, *hrf1*, *sec17*, *vps11*, *ptb1*, *hcs1* y *fps1*), la morfogénesis de la pared celular (genes *mnn9*, *pps1* y *smi1*), y el metabolismo del RNA (genes *rpc40*, *fcp1*, *smd3*, *prp4*, *dhp1* y *nat10*).

### 3.3 Fase estacionaria en *S. pombe* como modelo de envejecimiento cronológico

Los mecanismos que regulan el envejecimiento celular se conservan entre los diferentes modelos de células eucariotas. Diferentes estudios utilizando las levaduras como organismo modelo, sobre todo *S. cerevisiae*, han permitido identificar las rutas de señalización y las condiciones ambientales que regulan la duración de la vida, también descrito como envejecimiento (Kaeberlein et al., 2007). Caracterizar las rutas que regulan la entrada en fase estacionaria y el mantenimiento en esta condición en *S. pombe* es otra posible forma de acercarse al estudio sobre el envejecimiento.

#### 3.3.1 Envejecimiento replicativo y envejecimiento cronológico

En el estudio sobre el envejecimiento en levadura hay que distinguir entre envejecimiento replicativo y cronológico. Se define como envejecimiento replicativo el número de células que una célula madre es capaz de generar antes de su muerte, mientras que el envejecimiento cronológico se refiere al tiempo que una célula es capaz de sobrevivir en condición de fase estacionaria (Fabrizio and Longo, 2003; Roux et al., 2006). El estudio de los mecanismos que regulan el envejecimiento cronológico es el que nos permite extrapolar modelos para el envejecimiento en células de mamífero.

#### 3.3.2 Efecto de la escasez de nutrientes sobre el envejecimiento cronológico

El momento en que una célula entra en fase estacionaria y su capacidad para seguir, o no, viable en esta condición pueden depender del tipo de nutriente que resulte limitante. En *S. pombe* se han descrito los efectos sobre el envejecimiento cronológico en los casos de escasez de nitrógeno y glucosa.

### 3.3.2.1 Escasez de nitrógeno

La escasez de nitrógeno provoca en *S. pombe* la parada del ciclo celular en G1, la activación del proceso de conjugación y la entrada en meiosis. Este proceso es posible solamente si las células son sexualmente competentes, homotalicas ( $h^{90}$ ), o si están presentes a la vez los dos sexos distintos de células heterotalicas haploides.

En el caso de que haya células de un solo sexo la conjugación no es posible y la condición de falta de nitrógeno provoca que las células paren su ciclo en G1, con un contenido de DNA sin replicar, y puedan sobrevivir en esta condición durante mucho tiempo, siempre que haya presencia de glucosa. Estas células, además, adquieren las características fenotípicas y la resistencia a estrés por calor típicos de las células en fase estacionaria (Su et al., 1996).

### 3.3.2.2 Escasez de glucosa

Los efectos de la escasez de glucosa sobre la viabilidad pueden ser muy diferentes, tanto nocivos como beneficiosos.

Podemos considerar una condición de escasez de glucosa como una dieta para las células y hablar entonces de “restricción calórica”. La restricción calórica es la única condición no genética que se conozca capaz de alargar la esperanza de vida. Numerosos estudios en diferentes modelos eucariotas, levaduras, nematodos, ratones y células de mamífero, confirman que esta regulación de la longevidad es altamente conservada (Jiang et al., 2000; Kaeberlein et al., 2007; Longo and Fabrizio, 2002). La base de esta regulación está en la inactivación de rutas que señalizan la presencia de nutrientes, un cambio de una fase reproductiva a una no-reproductiva y la activación de la transcripción de rutas de respuesta a estrés.

La ruta de señalización de nutrientes evolutivamente más conservada y que resulta estar implicada en la regulación del envejecimiento es la ruta TOR (Jia et al., 2004; Kapahi et al., 2004; Powers et al., 2006). Otra

familia de proteínas implicada en la regulación del envejecimiento por restricción calórica es la de las sirtuinas, proteínas con función deacetilasa y relacionadas con el funcionamiento de la mitocondria. La relación entre restricción calórica, envejecimiento y sirtuinas esta aún por caracterizar (Guarente, 2008).

En *S. cerevisiae* otra ruta, además de TOR, que regula negativamente tanto el envejecimiento replicativo como el cronológico, es la ruta PKA (Dilova et al., 2007; Wei et al., 2008). Además, la deacetilasa Sir2 parece regular de forma positiva el envejecimiento replicativo y de forma negativa el cronológico, aunque el estudio sobre la función de esta proteína es aún causa de debate (Fabrizio et al., 2005; Kaeberlein et al., 2005; Lin et al., 2002)

En *S. pombe* las rutas mejor caracterizadas como las reguladoras del envejecimiento cronológico son las rutas de las quinasa Pka1 y Sck2, las responsables de señalar los nutrientes del medio. Mutaciones en estas dos proteínas permiten una esperanza de vida más larga en ausencia de restricción calórica (Roux et al., 2009; Roux et al., 2006). Recientemente se ha descrito un fenotipo de longevidad alargada, parecido a la de los mutantes de *sck2* y *pka1*, en una cepa delecionada para el gen *git3*, que codifica para el receptor asociado a proteína G de la ruta de Pka1 y necesario para la activación de la quinasa (Roux et al., 2009).

Hay poca información respecto a un posible papel de las sirtuinas en el envejecimiento cronológico en *S. pombe*. Lo único descrito es que la deleción de *sir2* empeora el fenotipo de corta viabilidad de una cepa con doble deleción para los genes de la superóxido dismutasa, *sod1*, y glutatión, *gsh1* (Mutoh and Kitajima, 2007).

Aunque la mayoría de los estudios apunta a que una dieta pobre en calorías es beneficiosa para el envejecimiento, eso no impide que haya situaciones en las que la escasez de glucosa pueda provocar toxicidad y ser dañina para las células. En *S. pombe* se ha descrito que la falta completa de glucosa produce un estrés oxidativo endógeno que llega a tener niveles tóxicos para la célula y activa las rutas de detoxificación de Sty1 y de Pap1 (Madrid et al., 2004). Una condición similar se ha descrito

en células tumorales de mamífero donde la falta de glucosa causa apoptosis debido a un aumento de ROS y a falta de producción de ATP (Lee et al., 1998; Liu et al., 2003).

#### 3.3.2.2.1 Restricción calórica y estrés oxidativo en la teoría del “aging”

El hecho de que la restricción calórica alarga la esperanza de vida es un hecho, pero cómo este mecanismo tiene lugar a nivel molecular es aún cuestión de debate e investigación (Masoro, 2005). Una de las primeras hipótesis, y aún la más popular, es que la dieta provoca una disminución de las actividades metabólicas, incluyendo una disminución de la respiración. Si las células tienen un menor consumo de oxígeno, menor será la producción de ROS. Como hemos dicho anteriormente, la homeostasis de ROS es esencial para el correcto funcionamiento celular: un incremento repentino de estas especies puede provocar graves daños e incluso la muerte (Reverter-Branchat et al., 2004; Sohal and Weindruch, 1996; Stadtman, 1992).

Recientemente, la veridicidad de esta teoría se está poniendo en entredicho porque los últimos estudios han demostrado que la restricción calórica provoca un aumento de la respiración, y no una disminución (Lin et al., 2002). La hipótesis que está tomando fuerza en los últimos años es que el aumento de respiración, provocado por la dieta, produce un incremento de ROS que no alcanzan un nivel tóxico para la célula pero que sí actúan como adaptación y protegen contra altas dosis de oxidantes. Estudios en diferentes organismos modelo han descrito esta situación (Barros et al., 2004; Bonawitz et al., 2007; Piper et al., 2006; Schulz et al., 2007).

### 3.3.3 Acumulación de especies tóxicas derivadas del metabolismo

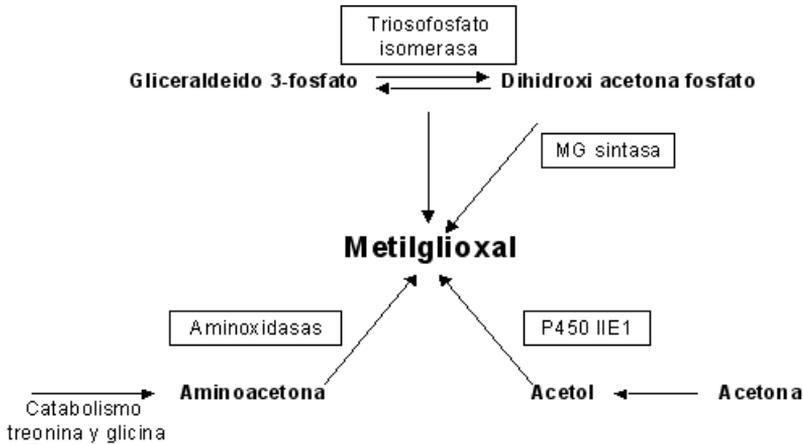
#### 3.3.3.1 ROS

Aunque puede que la producción de niveles mínimos de ROS sirva para que la célula se adapte a un estrés oxidativo más agudo, tal como

hemos descrito en el apartado anterior, esta descrito que las ROS son unas especies potencialmente toxicas producidas por el metabolismo celular. Un incremento elevado de la concentración de ROS, por ejemplo por ineficacia de los mecanismos de detoxificación o por mutaciones a nivel de la mitocondria, está relacionado con la aparición de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica, y con la muerte en algunos modelos animales, como ratón o *Caenorabditis elegans* (Ishii et al., 1998; Krishnan et al., 2007; Lin and Beal, 2006).

#### 3.3.3.2 Metilglioxal

El metilglioxal (MG) es un 2-oxoaldehido producido de forma fisiológica en diferentes procesos metabólicos de las células. En células eucariotas el metilglioxal es sintetizado principalmente durante la glicólisis por un proceso de  $\beta$ -eliminación a cargo de la enzima triosa fosfato isomerasa (Pompliano et al., 1990). La síntesis de este oxoaldehido a partir de triosas también puede ocurrir de forma no-enzimática (Phillips and Thornalley, 1993). Otras rutas metabólicas que pueden producir metilglioxal son la oxidación de la acetona por parte de isozimas que pertenecen al citocromo P450 2E1 (Inoue and Kimura, 1995) y la oxidación de amino acetona (formada durante el catabolismo de treonina y glicina) a través de la actividad de amino oxidasas (Lyles and Chalmers, 1992). Finalmente, en algunos procariotas, se produce metilglioxal por acción de la MG sintasa a partir de dihidroxiacetona fosfato (Cooper, 1984) (Fig. 5).



**Figura 5. Diferentes rutas de producción de MG.**

A pesar de que el MG se produzca de forma fisiológica, su toxicidad es elevada porque es capaz de reaccionar con moléculas de DNA o RNA, causando su daño o degradación, y con proteínas, causando su inactivación (Lo et al., 1994; Papoulis et al., 1995). Además, durante la producción y detoxificación de MG hay una producción de ROS que provoca estrés oxidativo y muerte celular por apoptosis (Du et al., 2000; Kalapos, 2008; Yim et al., 1995). Otra razón del aumento del estrés oxidativo en presencia de MG es la inactivación por parte del oxoaldehído de enzimas como glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa, y la disminución de la concentración de glutatión. Por su elevada toxicidad el MG está involucrado en procesos patológicos graves, como diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Beisswenger et al., 1999; Kalapos, 1999; Ramasamy et al., 2006).

Actualmente se desconoce por qué la célula produce este compuesto tan potencialmente tóxico para sí misma, pero la complejidad de su metabolismo hace pensar que pueda tener un papel importante a nivel fisiológico para la homeostasis celular o como señal de estrés (Booth et al., 2003). Un aumento en la producción de MG se ha descrito, por ejemplo, frente a estrés oxidativo y osmótico, tanto en mamífero como en levadura (Abordo et al., 1999; Aguilera and Prieto, 2001; Brownlee, 1995;

Inoue et al., 1998). Estas condiciones de estrés también activan las rutas de degradación del oxoaldehído.

El principal detoxificante de MG, tanto en bacterias como en levadura y mamífero, es el sistema glioxalasa (Inoue and Kimura, 1995). Este sistema requiere la intervención de dos enzimas, la glioxalasa I y II, y la presencia de glutatión reducido (GSH). En presencia de MG, una reacción espontánea con el glutatión lleva a la formación de hemitioacetal, sustrato de la glioxalasa I. El producto de la glioxalasa I es la S-D-lactoilglutatión, sustrato para la glioxalasa II, que produce D-lactato y glutatión (Kalapos, 1999).

En *S. cerevisiae*, los genes *GLO1* y *GLO2* codifican para las enzimas glioxalasa I y II respectivamente. La transcripción de *GLO1* aumenta en respuesta a un incremento intracelular de MG, debido tanto a un estrés osmótico como a un aumento del MG extracelular. Otros genes que se activan de forma Hog1-dependiente frente a estrés por MG son *GRE3*, que codifica para la enzima aldosa reductasa, y los genes para la síntesis de glicerol y trehalosa *GPD1*, *TPS1* y *TPS2*, importantes para el control de los niveles de triosas fosfato (Aguilera et al., 2005). Finalmente, un aumento en la concentración de MG intracelular activa al factor de transcripción Yap1, el homólogo de Pap1 en *S. pombe*, importante para la respuesta frente a estrés oxidativo (Maeta et al., 2004).

En la levadura *S. pombe* la glioxalasa I es codificada por el gen *glo1* (Takatsume et al., 2004). La activación de esta enzima frente a estrés osmótico, contrariamente a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, no parece ser Sty1-dependiente y su regulación no ocurre a nivel transcripcional, sugiriendo una regulación post-transcripcional (Takatsume et al., 2005)



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVO PRINCIPAL

Estudio de los niveles medioambientales y genéticos que regulan los niveles endógenos de estrés oxidativo en *Schizosaccharomyces pombe*; papel de la MAP quinasa Sty1 sobre el envejecimiento cronológico.

## OBJETIVOS

Partiendo de la observación inicial que la ruta de respuesta a estrés regulada por la quinasa Sty1 de *S. pombe* es indispensable para la promoción de la supervivencia en fase estacionaria (situación conocida como envejecimiento cronológico), quisimos determinar si la quinasa se activa en esa condición de estrés nutricional, cuál es la señal que la activa y cuál es su función en esa etapa de la curva de crecimiento.

Concretamente, nuestros objetivos han sido:

- 1 averiguar si Sty1 se activa en la transición a fase estacionaria, y si el metilglioxal tiene algún papel en dicha activación
- 2 caracterizar el efecto que diferentes factores medioambientales (concretamente, los niveles de glucosa) tienen sobre los niveles basales de estrés oxidativo
- 3 identificar que factores genéticos modulan los niveles endógenos de estrés oxidativo
- 4 averiguar si la activación de la quinasa Sty1, en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular, puede responder a diferentes niveles de estrés oxidativo endógeno
- 5 averiguar si se puede utilizar *S. pombe* como sistema modelo para estudiar el envejecimiento cronológico
- 6 determinar cuál es el papel de Sty1 en el envejecimiento cronológico en *S. pombe*.



## **RESULTADOS Y METODOLOGÍA**



## 1 EFECTOS DEL METILGLIOXAL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS DE RESPUESTA A ESTRÉS EN *S. pombe*

El metilglioxal es un oxoaldehído producido de forma fisiológica durante el proceso de la glicólisis y, en levadura, el papel mayoritario de producción de metilglioxal es a cargo de la enzima triosa fosfato isomerasa (Pompliano et al., 1990). A dosis elevada, este metabolito puede resultar tóxico para las células y provocar inhibición del crecimiento. El principal sistema de detoxificación de metilglioxal es el sistema glioxalasa, compuesto por las enzimas glioxalasa I y II (Inoue and Kimura, 1995). Se ha descrito que elevadas concentraciones de este oxoaldehído pueden provocar estrés oxidativo por un incremento en la concentración de ROS (Kalapos, 2008). En *S. pombe* las principales rutas de respuesta a estrés oxidativo son la ruta de la MAP quinasa Sty1 y la del factor de transcripción Pap1. Quisimos averiguar si había una relación entre el estrés producido por la toxicidad del metilglioxal y la activación de estas dos rutas y si la activación del sistema glioxalasa dependía de las rutas de respuesta a estrés.

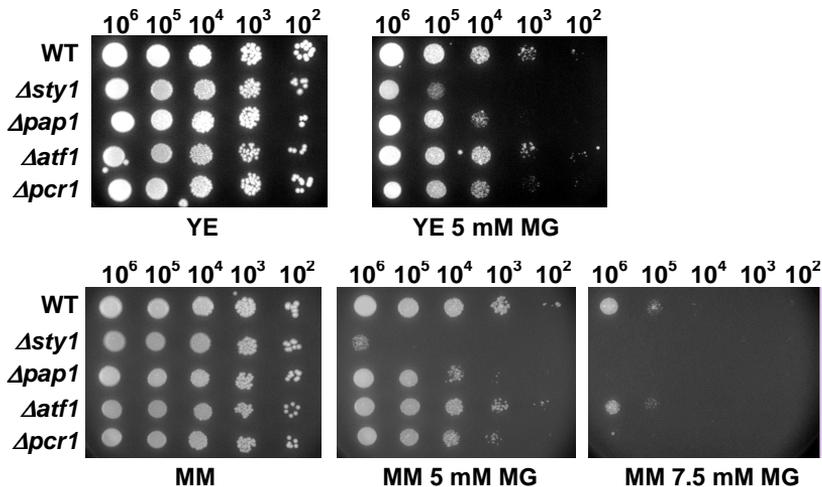
Este bloque de resultados incluye:

Resultados publicados en el artículo: "*The Glycolytic Metabolite Methylglyoxal Activates Pap1 and Sty1 Stress Responses in Schizosaccharomyces pombe.*" Alice Zuin, Ana P. Vivancos, Miriam Sansó, Yoshifumi Takatsume, José Ayté, Yoshiharu Inoue and Elena Hidalgo. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280 (44) 36708-36713.

Resultados no publicados que complementan los resultados anteriores.

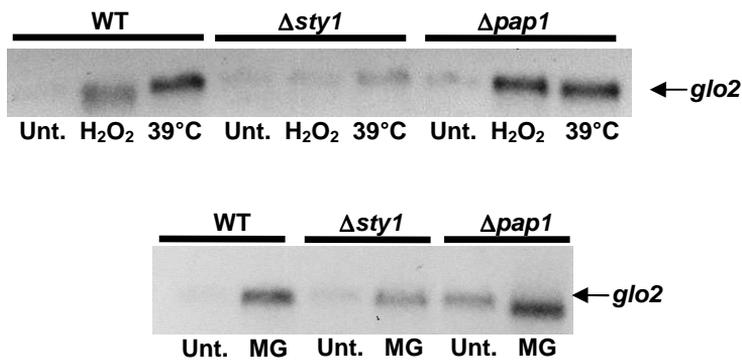
### 1.1 La resistencia frente a tratamiento con metilgloxal y la activación de su ruta de detoxificación requieren la actividad de las rutas de Pap1 y de Sty1

Para averiguar cuales son las rutas importantes para resistir a un estrés por metilgloxal (MG) lo primero que hicimos fue averiguar la viabilidad de una cepa salvaje, así como la de cepas delecionadas en los genes *sty1*, *pap1*, *atf1* y *pcr1*, frente a tratamiento con diferentes concentraciones de MG en placa. La concentración de 10 mM resultó ser toxica para cualquier cepa, tanto en medio rico (YE) como en medio mínimo (MM). En ambos tipos de medio, la cepa que resultó ser más sensible al tratamiento fue la defectuosa en la ruta de Sty1. Al contrario, la cepa delecionada en *atf1* no presenta sensibilidad a MG, lo que nos hizo concluir que la respuesta a este tipo de estrés mediada por Sty1 no depende de la activación del factor de transcripción. Las cepas delecionadas en *pap1* y *pcr1* presentaron un fenotipo intermedio entre el de viabilidad de la cepa salvaje y el de máxima sensibilidad de la cepa delecionada en *sty1* (Fig. 6, (Zuin *et al.* 2005).



**Figura 6. La falta de las rutas de Pap1 y de Sty1 afecta a la viabilidad celular en presencia de MG.** Viabilidad de cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ), AV25 ( $\Delta pap1$ ), AV15 ( $\Delta atf1$ ) y MS5 ( $\Delta pcr1$ ) en medio sólido rico (YE) o mínimo (MM) en presencia o no de diferentes concentraciones de MG.

Para averiguar si la activación de la ruta de detoxificación de MG depende de las rutas de respuesta a estrés de Sty1 y de Pap1, analizamos la expresión del gen *glo2*, que codifica para la glioxalasa II, frente a estrés oxidativo y por calor. Estas dos condiciones se escogieron en base a los resultados de estudios de microarrays publicados por Chen, donde resulta que tanto la expresión de *glo1* como de *glo2* aumenta 2-3 veces frente a estos dos tipos de estrés (Chen et al., 2003). Los resultados del Northern blot confirmaron los datos de los microarrays y mostraron que la activación de *glo2* frente a estrés es dependiente de Sty1 pero no de Pap1 (Fig. 7, (Zuin et al. 2005). Los mismos resultados fueron obtenidos tratando las células con MG extracelular.

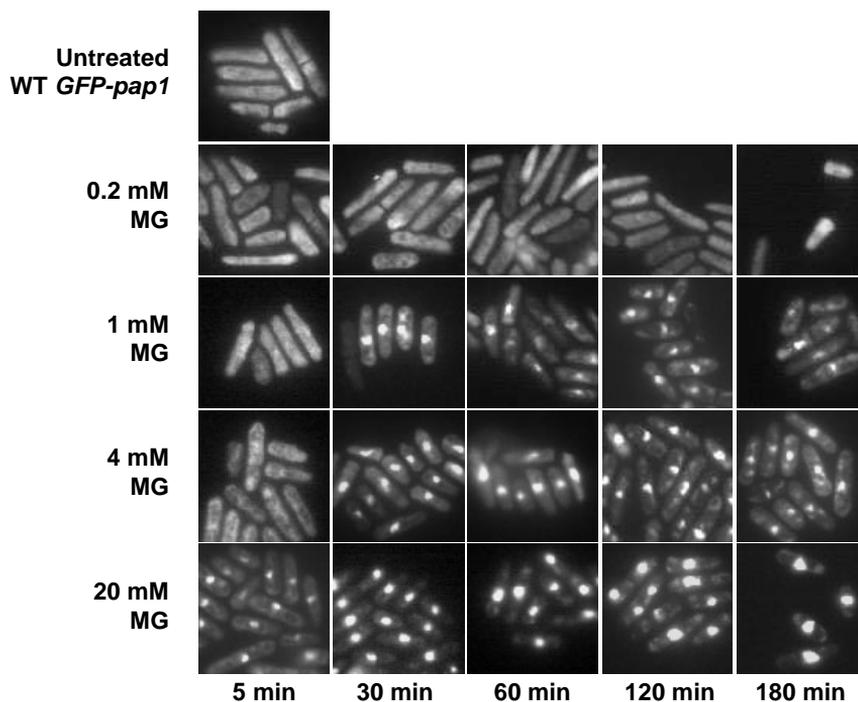


**Figura 7. Diferentes tipos de estrés activan la expresión de la glioxalasa II de forma Sty1 dependiente y Pap1 independiente.** Análisis Northern blot de la expresión del gen *glo2* en las cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ) y AV25 ( $\Delta pap1$ ). Las condiciones consideradas son: sin tratar, estrés oxidativo de  $H_2O_2$  1 mM durante 15 minutos, estrés por calor de  $39^\circ C$  durante 30 minutos y estrés por MG 8 mM durante 60 minutos.

## 1.2 La presencia de metilglioxal extracelular activa la ruta de Pap1

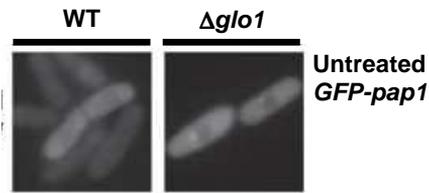
Después de haber averiguado que las rutas de Pap1 y de Sty1 son necesarias para mantener la viabilidad frente a estrés por MG, decidimos averiguar si estas dos rutas se activan por este metabolito tóxico.

Para averiguar la cinética de activación de Pap1 en respuesta a diferentes dosis de MG se estudió la localización subcelular de GFP-Pap1 en cinéticas de tiempo y concentración del oxoaldehído en el medio. Se observó que una concentración de 1 mM de MG era suficiente para acumular Pap1 en el núcleo tras treinta minutos de tratamiento. El uso de una dosis más elevada permitía acelerar este proceso (Fig. 8).



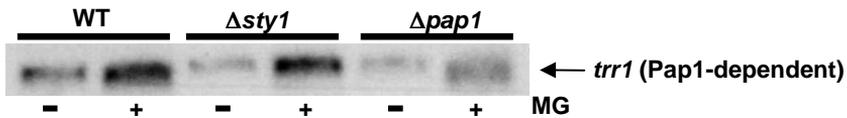
**Figura 8. La cinética de la activación de Pap1 tras tratamiento con MG depende de la concentración del oxoaldehído.** Localización subcelular de GFP-Pap1 en la cepa EHH14 (cepa  $\Delta pap1$  que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) en cinéticas de tiempo y concentración de MG.

Utilizando la fusión GFP-Pap1 en una cepa delecionada en *glo1* averiguamos que el posible incremento intracelular, debido a la inactivación de la ruta de detoxificación, no es suficiente para activar la ruta de Pap1 (Fig. 9, (Zuin *et al.* 2005).



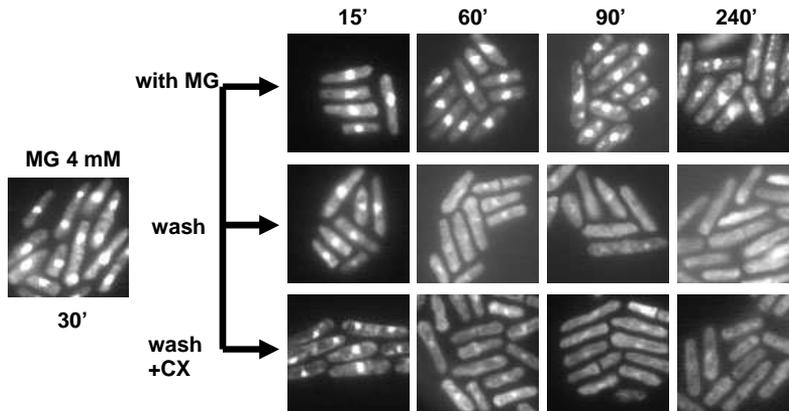
**Figura 9. Los niveles intracelulares de MG en una cepa  $\Delta glo1$  no son suficientes para activar Pap1 de forma constitutiva.** Localización subcelular de la proteína de fusión GFP-Pap1 expresada por el plásmido pRep41-GFP-Pap1 en la cepa 972 (WT) y  $\Delta glo1$  ( $\Delta glo1$ ).

Un ensayo de Northern blot de un gen Pap1-dependiente (*trr1*) después de haber tratado las células con MG nos permitió confirmar que la localización nuclear de Pap1 ocurre a la vez que su activación (Fig. 10, (Zuin *et al.* 2005).



**Figura 10. En respuesta a MG extracelular se activa la respuesta Pap1-dependiente.** Northern blot análisis de la expresión del gen *trr1* (tioredoxina reductasa) antes y después de tratamiento con MG 8 mM durante treinta min. El RNA se obtuvo de las cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ) y AV25 ( $\Delta pap1$ ).

Para averiguar cómo es capaz MG de activar Pap1, después de tratar las células con el oxoaldehído y de observar su localización nuclear, se lavaron las células y se hizo una cinética, para averiguar la localización del factor de transcripción, tras haber quitado el tóxico. La activación de Pap1 resulto ser una activación reversible porque, una vez lavado el MG, la proteína vuelve a ser citoplasmática. Para confirmar que la salida de Pap1 del núcleo no fuera un artefacto debido a la producción de nuevas moléculas de la proteína, la misma cinética se hizo tratando o no tratando las células con cicloheximida (CX), un inhibidor de la síntesis proteica (Fig. 11).



**Figura 11. La activación de Pap1 por tratamiento con MG es reversible.** Células de la cepa EHH14 fueron tratadas con MG 4 mM durante 30 minutos para localizar Pap1 en el núcleo. Seguidamente, se centrifugaron las células y se resuspendieron en tres medios distintos: con MG (with MG), sin MG (wash) y sin MG con cicloheximida (wash+CX). De los tres cultivos se realizó una cinética para observar la localización de Pap1.

### 1.3 La zona C-CRD de la proteína Pap1 es necesaria y suficiente para su activación frente a estrés por MG

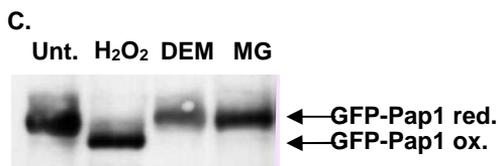
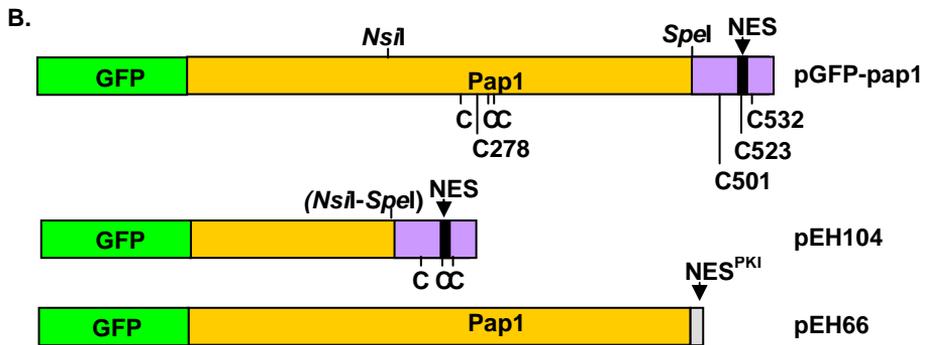
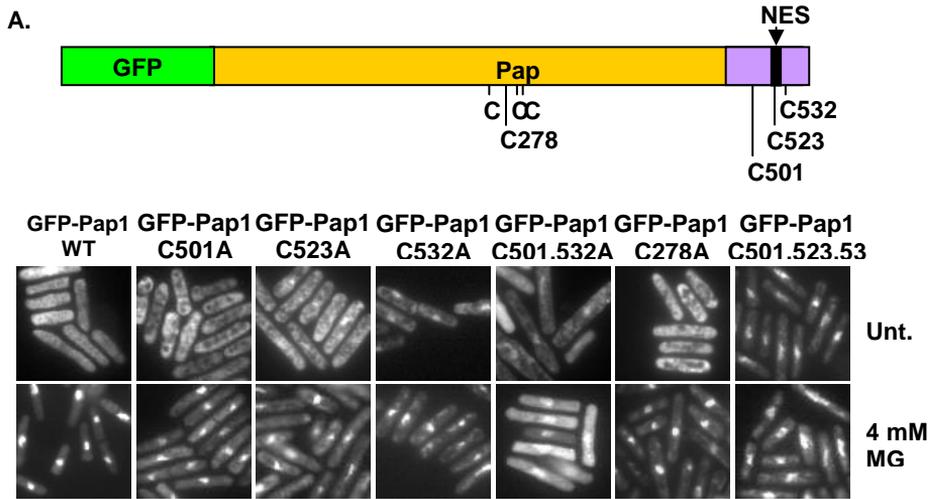
Se conoce que la activación de Pap1 frente a estrés oxidativo se produce de forma distinta dependiendo del tipo de oxidante. En el caso de un estrés por  $H_2O_2$  se forma un puente disulfuro reversible entre la cisteína 278 de la región N-terminal (N-CRD) y la cisteína 501 o 532 de la región C terminal (C-CRD). En la activación irreversible por el agente alquilante dietilmaleato (DEM) la acumulación de Pap1 en el núcleo es debida a la alquilación de cualquiera de sus tres cisteínas del dominio C-CRD (Castillo et al., 2002).

Quisimos averiguar qué tipo de activación de Pap1 es la producida por MG, si reversible o no. Mediante el análisis de la localización subcelular de mutantes por sustitución de la proteína GFP-Pap1, pudimos determinar el papel de ciertos residuos de cisteína de Pap1 en respuesta a MG. La sustitución a alanina de un solo residuo de cisteína, cualquiera de los analizados, generaba una proteína igualmente capaz de acumularse en el núcleo en respuesta a MG. No pudimos averiguar cuál

era el efecto de la triple mutación de las tres cisteína del C-CRD porque en este mutante la localización de Pap1 es constitutivamente nuclear (Fig. 12 A, (Zuin *et al.* 2005).

Decidimos entonces utilizar mutantes de la proteína GFP-Pap1, expresadas por plásmidos, que no tuvieran la región N-CRD (plásmido pEH104) o la región C-CRD (plásmido pEH66) para averiguar si una de estas dos zonas ricas en cisteínas era importante para la activación frente a MG. La región C-CRD resultó ser necesaria y suficiente para la activación de Pap1 frente a tratamiento con el oxoaldehído (Fig. 12 B, (Zuin *et al.* 2005).

Finalmente, para averiguar si la activación de Pap1 ocurre por la formación de un puente disulfuro, como en el caso de la activación por peróxido, obtuvimos extractos proteicos específicos para analizar el estado redox de Pap1. La técnica de obtención de extractos TCA permite congelar la situación redox intracelular por acidificación del medio a través de la adición de TCA en el momento de recogida de la muestra celular. A continuación se obtiene un extracto proteico en un medio de TCA y se precipitan las proteínas. Se eliminan los restos de ácido y se resuspende el precipitado en un tampón que contiene iodoacetamida (IA), que alquila y bloquea la reactividad de los grupos SH de los residuos cisteína. Finalmente, se realiza una electroforesis desnaturalizante no reductora, que mantiene el puente disulfuro en Pap1, seguida de una inmunodetección con anticuerpo anti-Pap1. La forma oxidada de Pap1 presenta una movilidad en el gel de poliacrilamida diferente a la de la forma reducida, probablemente debido a que el puente disulfuro induce un cambio conformacional en la proteína. Gracias a esta técnica pudimos concluir que el tratamiento por MG no induce en la proteína Pap1 la formación de un puente disulfuro, siendo su caso más similar a lo que ocurre con tratamiento con dietilmaleato (Fig. 12 C, (Zuin *et al.* 2005).



**Figura 12. La región C-CRD de Pap1 es suficiente para sensor el MG.**

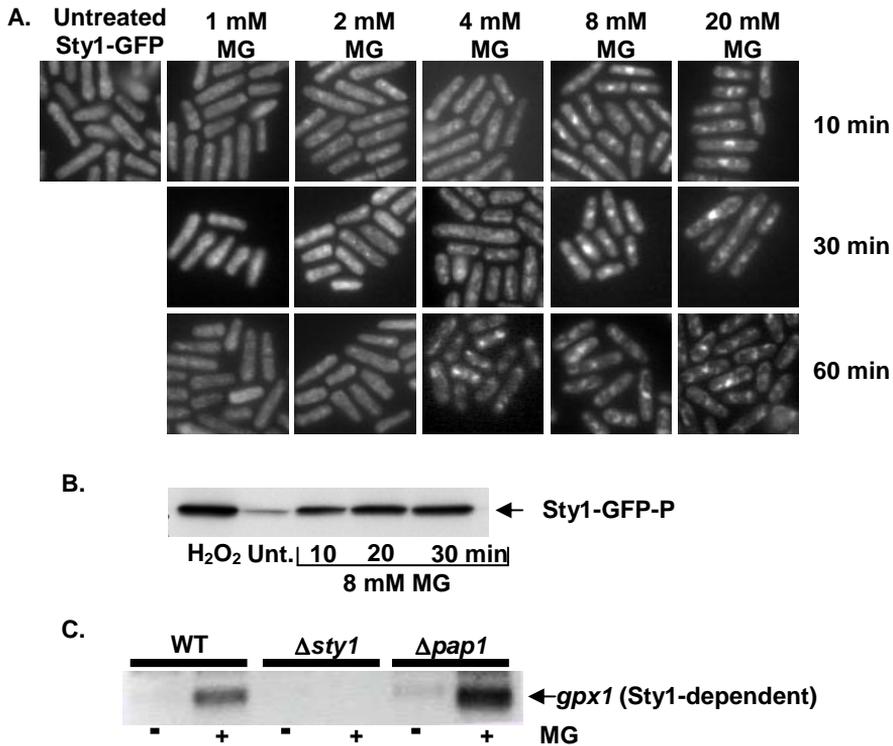
A. Representación esquemática de la proteína Pap1 y sus regiones CRD. Estudio de la localización de GFP\_Pap1 frente a estrés por MG en diferentes mutantes por sustitución de las cisteínas de Pap1. B. Representación esquemática de las proteínas GFP\_Pap1, salvaje y mutantes, expresadas por los plásmidos pGFP\_Pap1, pEH104 y pEH66. Estudio de la localización de estas proteínas de fusión frente a tratamiento por MG. C. Estudio de la oxidación *in vivo* de Pap1 con extractos proteicos de TCA. La cepa EHH14 fue tratada, o no (Unt.), con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mM durante 5 minutos, con DEM 4 mM o MG 8 mM ambos durante 40 minutos.

#### 1.4 **Sty1 es activado por altas dosis de metilglioxal extracelular**

Después de averiguar cuales eran las dosis y los tiempos necesarios para la activación de Pap1 quisimos estudiar si también la quinasa Sty1 se activa por tratamiento con MG y a qué concentraciones y tiempos. Gracias a una cinética obtenida con la cepa EHH5, que expresa la proteína de fusión Sty1-GFP, resultó que la MAP quinasa también es activada por MG, pero su activación necesita dosis más altas respecto a las que activan a Pap1: el factor de transcripción necesita una dosis mínima de 1 mM MG para activarse a los treinta minutos mientras que Sty1 necesita una concentración de MG de 4 mM para activarse a los 60 minutos o de 8 mM para activarse a los 10 minutos (Fig. 13 A, (Zuin *et al.* 2005).

Un ensayo de Western blot para analizar el estado de fosforilación de Sty1 tras tratamiento con el oxoaldehído nos confirmó la activación de la quinasa después de haber tratado las células con 8 mM MG durante diez, veinte o treinta minutos (Fig. 13 B, (Zuin *et al.* 2005).

Obtuvimos una última confirmación con un ensayo de Northern blot para averiguar la activación de la expresión de genes Sty1-dependientes (como *gpx1*) tras tratamiento con MG (Fig. 13 C, (Zuin *et al.* 2005).



**Figura 13. Sty1 se activa por tratamiento con altas dosis de MG.**

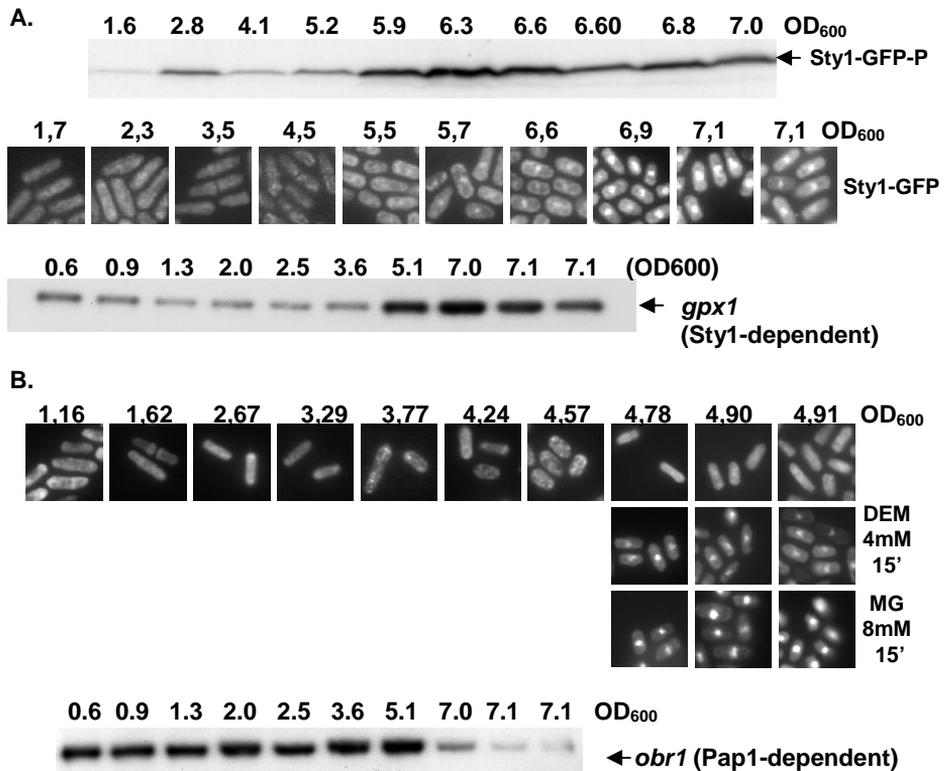
A. Localización subcelular de GFP-Sty1 en la cepa EHH5 (cepa  $\Delta sty1$  que posee un alelo GFP-Pap1 integrado en el cromosoma bajo el control de un promotor *nmt* de fuerza intermedia) en cinéticas de tiempo y concentración de MG. B. Western blot análisis de la forma fosforilada de Sty1 en la cepa EHH5 tras tratamiento con MG a dosis y tiempo indicados. C. Northern blot análisis de la expresión del gen *gpx1* (glutathion peroxidasa) antes y después de tratamiento con MG 8 mM durante treinta minutos. El RNA se obtuvo de las cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ) y AV25 ( $\Delta pap1$ ).

### 1.5 Sty1, pero no Pap1, se activa en condición de fase estacionaria

Esta descrito para la levadura *S. cerevisiae* que la concentración intracelular de MG aumenta con el crecimiento del cultivo celular hasta tener su concentración máxima cuando las células entra en fase estacionaria (Maeta et al., 2004). Decidimos entonces averiguar si la quinasa Sty1 o el factor de transcripción Pap1, que son activados frente a

estrés por MG extracelular, también se activan al entrar las células en fase estacionaria. Para eso analizamos las células a lo largo de la curva de crecimiento, desde la fase logarítmica hasta la transición a la fase estacionaria. Analizamos la activación de las dos proteínas tanto a nivel de localización celular, gracias a las proteínas de fusión con GFP, como a nivel de activación de la transcripción de genes dependientes (Fig. 14 A y B, (Zuin *et al.* 2005). Para Sty1 se observó también su perfil de fosforilación a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 14 A, (Zuin *et al.* 2005). Resultó que Sty1, pero no Pap1, se activa al entrar en fase estacionaria. Además, contrariamente a lo que se describió para *S. cerevisiae*, la concentración de MG intracelular no aumenta con el crecimiento del cultivo (Inoue, comunicación personal). No hubo entonces ninguna evidencia experimental que apuntara a la concentración de MG como la causa de la activación de Sty1 en fase estacionaria.

Para confirmar que la falta de fosforilación de Pap1 en fase estacionaria no fuera debida a una inactividad de la proteína en esta fase del crecimiento, analizamos su localización nuclear en células en fase estacionaria tras tratamiento con MG extracelular que nos confirmó la capacidad de activación del factor transcripción (Fig. 14 B, (Zuin *et al.* 2005).



**Figura 14. Sty1, pero no Pap1, se activa en condición de fase estacionaria.**

A. Analisis de la actividad de Sty1 en condición de fase estacionaria. La cepa EHH5 fue utilizada para analizar la fosforilación de Sty1, su localización nuclear y la activación de genes Sty1 dependientes gracias a ensayos de Western blot, cinética por microscopia y Northern blot respectivamente. B. Analisis de la actividad de Pap1 en condición de fase estacionaria. La cepa EHH14 fue utilizada para analizar la localización nuclear y la activación de genes Pap1 dependientes utilizando cinética por microscopia y Northern blot respectivamente. En condición de fase estacionaria (OD<sub>600</sub> 4.78; 4.90; 4.91), las células se trataron, o no, con DEM o MG, a las concentraciones y tiempos indicados, para confirmar la capacidad de Pap1 de activarse en esta condición del crecimiento.

Zuin A, Vivancos AP, Sansó M, Takatsume Y, Ayté J, Inoue Y, Hidalgo E.

*The glycolytic metabolite methylglyoxal activates Pap1 and Sty1 stress responses in Schizosaccharomyces pombe.*

J Biol Chem. 2005 Nov 4;280(44):36708-13.

## 2 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE DEFECTOS MITOCONDRIALES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ENVEJECIMIENTO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas derivadas del metabolismo aeróbico de las células y que se producen principalmente a nivel de la mitocondria durante la respiración. La homeostasis de las ROS es de gran importancia porque un aumento de sus concentraciones es tóxico para la célula y puede provocar disfunciones e incluso muerte celular.

La levadura *S. pombe* es un organismo aeróbico que en presencia de glucosa fermenta (efecto Crabtree) pero que, en condición de escasez de nutrientes, es capaz de respirar (Poole and Lloyd, 1973).

Suponemos que, dependiendo del tipo de medio de cultivo más o menos rico en fuentes de carbono, las células respirarán con un porcentaje distinto y tendrán entonces una concentración distinta de ROS intracelular. Encaramos nuestros experimentos para confirmar esta hipótesis, y seguidamente hicimos una selección de mutantes que fueran sensibles, a la vez, a estrés oxidativo extrínseco e intrínseco (el que es producido por una elevada tasa de respiración). Los resultados se describen a continuación.

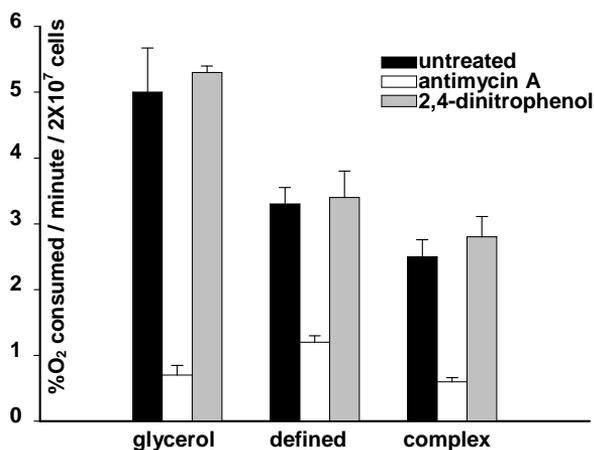
Este bloque de resultados incluye:

Resultados publicados en el artículo: "*Mitochondrial Dysfunction Increases Oxidative Stress and Decreases Chronological Life Span in Fission Yeast.*" Alice Zuin, Natalia Gabrielli, Isabel A. Calvo, Sarela García-Santamarina, Kwang-Lae Hoe, Dong Uk Kim, Han-Oh Park, Jacqueline Hayles, José Ayté, Elena Hidalgo. PLoS One. 2008 Jul 30; 3(7):e2842.

Resultados no publicados que complementan los resultados anteriores.

## 2.1 **En fase exponencial las células tienen una tasa de consumo de oxígeno distinta dependiendo del medio de cultivo**

Normalmente se utilizan dos medios fermentables distintos para crecer los cultivos de *S. pombe*: medio mínimo (MM, defined) con 2% de glucosa y medio rico (YE, complex) con 3% de glucosa. Decidimos entonces que el primer paso era averiguar si las células consumían oxígeno en estos dos medios y si la tasa de consumo era distinta entre los dos. Como control positivo utilizamos un cultivo celular con glicerol como fuente de carbono para que las células no pudieran fermentar. Resultó que las células consumen más oxígeno en el medio con menor porcentaje de glucosa (MM, defined) respecto al de mayor porcentaje (YE, complex). La tasa más alta se registró en el cultivo con glicerol, lo que nos indicó que en los dos primeros medios hay también un porcentaje de fermentación. Quisimos confirmar que la tasa de consumo de oxígeno observada fuera debida a respiración. Para eso añadimos a los cultivos el inhibidor de la respiración antimicina A, que bloquea el complejo III de la cadena de transporte de electrones, o el desacoplante 2,4-dinitrofenol, que inhibe la producción de ATP pero no debería afectar el consumo de oxígeno. Como esperábamos, el consumo de oxígeno disminuyó en los cultivos tratados con antimicina A pero no en los que contenían 2,4-dinitrofenol (Fig. 15, (Zuin *et al.* 2008).



**Figura 15. Consumo de oxígeno en diferentes medios de cultivo.**

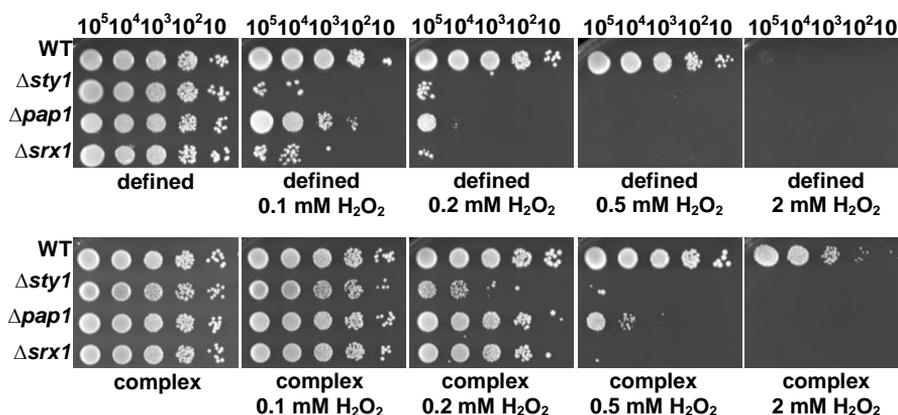
Porcentaje del consumo de oxígeno de la cepa salvaje 972 en fase exponencial en medio mínimo con 2% glicerol y 0.2% glucosa (glycerol), en medio mínimo con 2% glucosa (defined) y en medio rico con 3% glucosa (complex) y en presencia, o no, de los inhibidores mitocondriales antimicina A o 2,4-dinitrofenol.

Concluimos, además, que los valores de respiración en presencia de glucosa y en fase exponencial son más elevados en *S. pombe* que en *S. cerevisiae*.

## 2.2 La tasa de consumo de oxígeno es directamente proporcional al nivel de estrés oxidativo endógeno

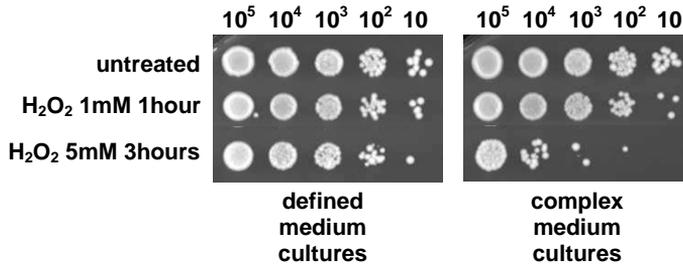
Según nuestra hipótesis, las células que respiran más, y que tienen entonces una mayor actividad mitocondrial, deberían tener unos valores de estrés oxidativo intrínseco más elevados. Para confirmarlo, analizamos la viabilidad de una cepa salvaje, así como de cepas delecionadas en los genes para la respuesta a estrés oxidativo *sty1*, *pap1* y *srx1*, frente a tratamiento con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  en placa. Para el cultivo líquido se utilizó MM, para que las células tuvieran una respiración más elevada, y se utilizaron tanto placas de MM (complex) como de YE (defined). Los resultados nos indicaron que las cepas emplacadas en medio mínimo eran más sensibles a los

tratamientos con  $H_2O_2$  porque sumaban al tratamiento de peróxido la dosis intrínseca de ROS, más elevada respecto a las células emplacedas en medio rico (Fig. 16, (Zuin *et al.* 2008).



**Figura 16. La resistencia a tratamiento con estrés oxidativo en placa depende del tipo de medio de cultivo.** Viabilidad de cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ), AV25 ( $\Delta pap1$ ), AV15 ( $\Delta atf1$ ) y EA38 ( $\Delta srx1$ ) en medio sólido rico o mínimo en presencia o no de diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .

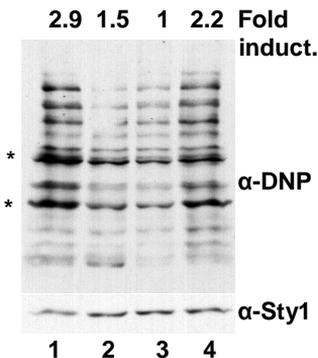
Hicimos, además, un ensayo de sensibilidad a  $H_2O_2$  en medio líquido. Se compararon células creciendo en los dos distintos medios y se añadió el estrés a distintas concentraciones, y durante tiempos distintos, antes de sembrar las células. En este caso las células en MM resultaron más resistentes a  $H_2O_2$  que las del cultivo de YE, porque utilizar un medio que favorece la respiración y un nivel más elevado de estrés oxidativo endógeno prepara mejor las células a un sucesivo estrés de  $H_2O_2$  (Fig. 17).



**Figura 17. El crecimiento en MM líquido prepara las células para un sucesivo estrés.** La cepa salvaje 972 se creció en medio líquido mínimo (defined) o rico (complex) y se trataron en fase exponencial con  $H_2O_2$  1 mM o 5 mM, durante 1 o 3 horas, respectivamente. Después de cada tratamiento el mismo numero de células ( $10$ - $10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico.

Para acabar de confirmar que había diferencias de estrés oxidativo intrínseco entre células que crecían en medios distintos se determinó el estado de carbonilación de cepas salvajes creciendo aeróbicamente en fase exponencial en los dos medios. En efecto, las células creciendo en medio mínimo poseen niveles de ROS basales superiores a las que crecen en medio rico, y el daño sobre las proteínas es más elevado (Fig. 18).

**Figura 18. El nivel de ROS intrínseco depende del tipo de medio de cultivo.**



Patrón de carbonilación proteica por modificación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) de células salvajes (cepa 972) en crecimiento exponencial aeróbico en medio mínimo (2) y rico (3). Controles de una aumento del nivel de carbonilación por tratamiento con  $H_2O_2$  2 mM 30 min. se hicieron tanto para el medio mínimo (1) como para el medio rico (4). Las muestras fueron detectadas con anticuerpo  $\alpha$ -DNP y  $\alpha$ -Sty1 para cuantificar. Los números que indican la diferencia de expresión entre las diferentes muestras (Fold induct.) se obtuvieron calculando el ratio entre la intensidad de las bandas marcadas por \* y la de la banda correspondiente a Sty1.

### 2.3 Identificación de mutantes sensibles a elevadas dosis de ROS intracelulares

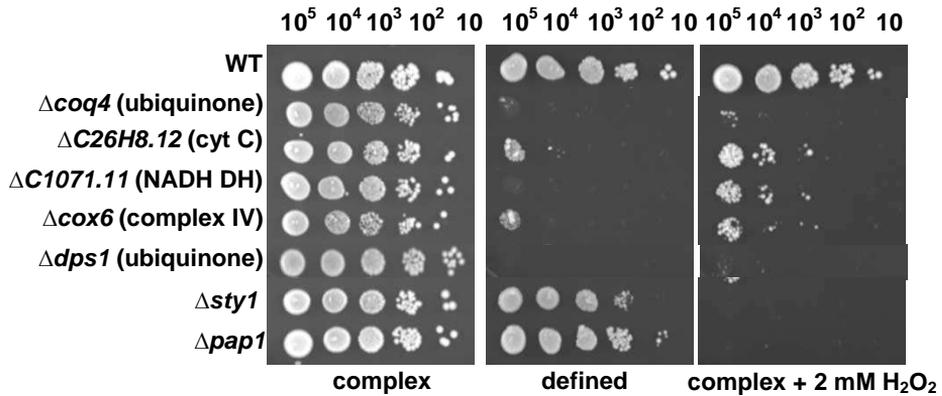
Recientemente el laboratorio ha adquirido una colección de mutantes por delección que se compone de 2700 cepas distintas. Quisimos

aprovechar esta herramienta para hacer una selección que nos permitiera aislar mutantes sensibles a estrés oxidativo intrínseco. La selección se basó en seleccionar cepas que fueran sensibles tanto a crecimiento en placa de medio mínimo como a crecimiento en placa de medio rico en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La primera selección nos permitía aislar cepas probablemente sensibles al estrés oxidativo intrínseco producido por el elevado consumo de oxígeno (o por la incapacidad de detoxificar ROS). Para descartar mutantes que no crecían en placas de medio mínimo por problemas de auxotrofia, establecimos como segunda condición que los mutantes, además, no fueran capaces de crecer en placa de medio rico en presencia de 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hipotetizamos que los mutantes incapaces de sobrevivir a estrés extrínseco por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serían también incapaces de detoxificar las ROS intrínsecas derivadas de la respiración en MM. Natalia Gabrielli e Isabel Calvo, miembros del laboratorio, realizaron la doble selección. Aislamos 51 mutantes, 19 de los cuales eran genes necesarios para diferentes funciones mitocondriales y, en el caso específico de 12 de estos 19, para el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (Tabla 1).

Decidimos entonces seleccionar y caracterizar algunos de estos mutantes. Escogimos las cepas delecionadas en los genes: *coq4* y *dps1*, necesarios para la síntesis del coenzima Q, *C26H8.12*, codificante por una proteína necesaria para el enlace citocromo c-heme, *cox6*, para la subunidad IV de la citocromo c oxidasa, y *C1071.11*, codificante para una posible NADH oxidoreductasa (Fig. 19).

**Tabla 1. Genes mitocondriales necesarios para la viabilidad frente a estrés oxidativo intrínseco (crecimiento en medio mínimo) y extrínseco (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular)**

<b>NAME</b>	<b>FUNCTION</b>
<b>C26H8.12</b>	Covalently the heme group to the apoprotein of cytochrome c
<b>C1071.11</b>	NADH dependent oxidoreductase; contains a flavin like domain
<b>rip1</b>	Subunit of cytochrome bc1, also known as respiratory complex III
<b>sco1</b>	Copper chaperone protein, essential for complex IV assembly
<b>C1672.04c</b>	High similarity to <i>S.Cerevisiae</i> cox19p; which is metal transport for complex IV assembly
<b>dps1</b>	Decaprenyl diphosphate synthase, required for ubiquinone biosynthesis
<b>cox6</b>	Heme A-containing chain of cytochrome c oxidase
<b>coq2</b>	Required for ubiquinone biosynthesis
<b>coq3</b>	Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase.Ubiquinone biosynthesis
<b>coq4</b>	Ubiquinone biosynthesis protein
<b>coq5</b>	C-methyltransferase, ubiquinone biosynthetic process and aerobic respiration
<b>coq10</b>	Electron transport and cellular respiration.Ubiquinone biosynthesis
<b>C336.13c</b>	Removal of transit peptides required for targeting of proteins from mitochondrial matrix
<b>tom70</b>	Receptor that accelerates the import of all mitochondrial precursor proteins
<b>C8C9.06c</b>	Mitochondrial translation regulator , PPR domains
<b>mss1</b>	GTPase involved in 5-carboxymethylaminomethyl modification of mitochondrial tRNAs
<b>C2G2.07c</b>	Mitochondrial ribosomal protein (small subunit)
<b>C25B2.04c</b>	Mitochondrial ribosome assembly protein
<b>C1610.02c</b>	Mitochondrial ribosomal protein I1



**Figura 19. Selección de mutantes incapaces de sobrevivir a altas dosis de ROS.**

El crecimiento de algunos mutantes mitocondriales es inhibido tanto en medio mínimo (defined) como en medio rico con peróxido de hidrógeno (complex + 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las cepas 972 (WT) y los mutantes *Δcoq4* y *Δdps1* (ubiquinona), *ΔC26H8.12* (citocromo C), *Δcox6* (complejo IV), *ΔC1071.11* (NADH DH), AV18 (*Δsty1*) y AV25 (*Δpap1*) se crecieron en medio líquido rico y se emplacaron de 10 a 10<sup>5</sup> células en los medios sólido indicados.

#### 2.4 El uso de condiciones anaeróbicas o de antioxidantes mejora los defectos de crecimiento de los mutantes mitocondriales

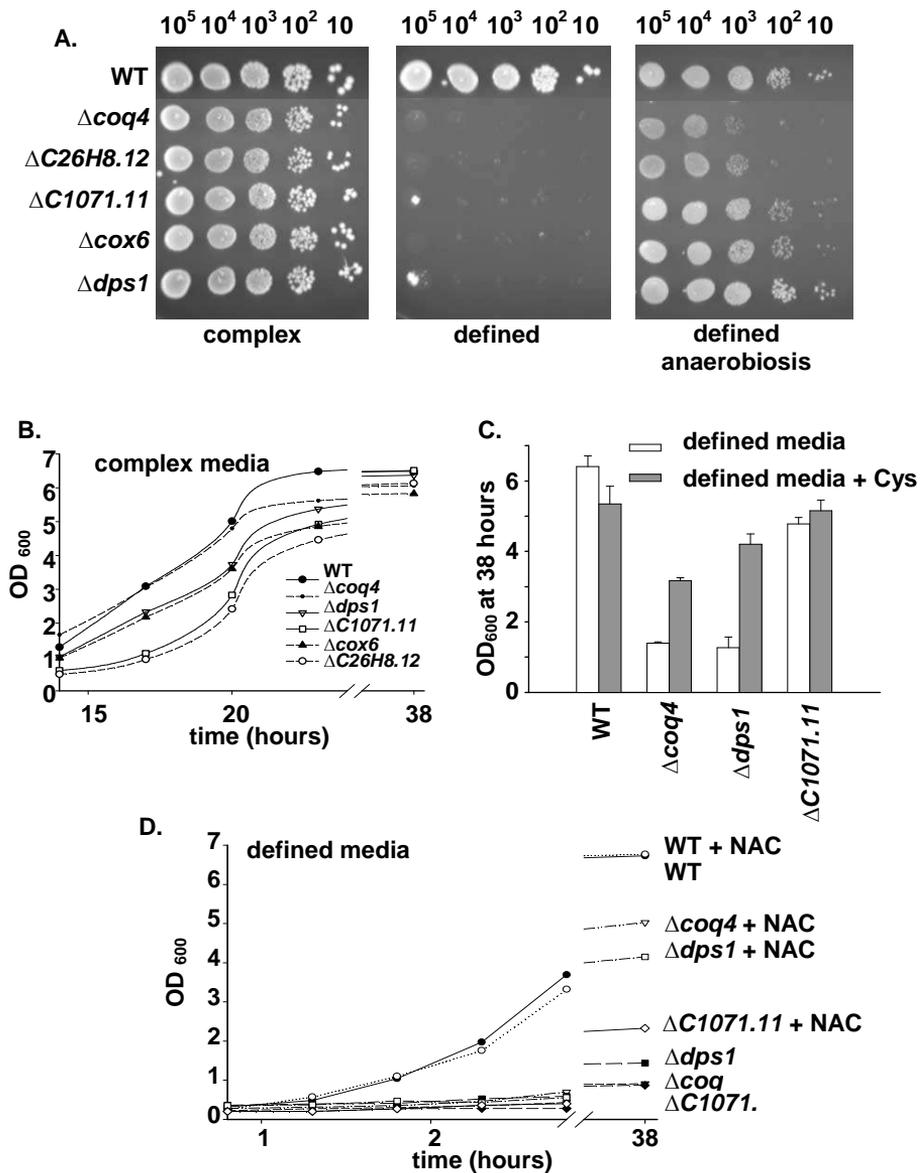
Para confirmar que los mutantes mitocondriales tenían crecimiento defectuoso en MM debido a un nivel excesivo de ROS intrínsecas, decidimos crecer estas cepas en condiciones que aliviaran la toxicidad asociada a ROS. Escogimos dos estrategias distintas.

Por una banda crecimos las células en medio rico y emplacamos diluciones seriales en medio mínimo en condiciones anaeróbicas. La condición anaeróbica se consiguió utilizando placas Anaerocult (Merck) en contacto con las placas y aisladas del ambiente a través de una contenedor cerrado.

La segunda estrategia fue añadir diferentes tipos de antioxidantes durante el crecimiento en medio mínimo líquido. Para esta prueba escogimos los antioxidantes cisteína (Cys) y N-acetilcisteína (NAC) a diferentes concentraciones.

Ambas pruebas nos dieron resultados positivos. Las condiciones anaeróbicas mejoraron el crecimiento en MM de las cinco cepas testadas, alguna de forma parcial y otras obteniendo la misma viabilidad que la cepa salvaje (Fig. 20 A, (Zuin *et al.* 2008).

Respecto a los antioxidantes, la cisteína a una concentración de 0.1 mg/ml y la NAC a 1.6 g/ml permitieron rescatar parcialmente el fenotipo de letalidad en medio mínimo de las cepas  $\Delta coq4$ ,  $\Delta dps1$  y  $\Delta C1071.11$  (Fig. 20 C y D, (Zuin *et al.* 2008).



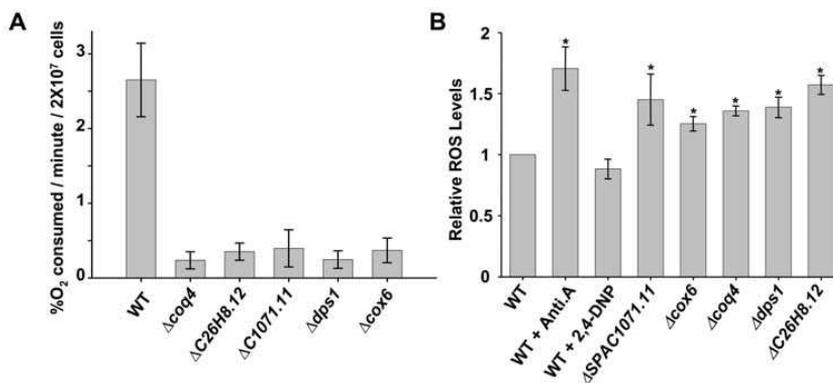
**Figura 20.** La deficiencia de crecimiento en medio mínimo de los mutante mitocondriales es aliviada por la ausencia de oxígeno o por el uso de antioxidantes. A. Las cepas 972 (WT) y los mutantes  $\Delta coq4$  y  $\Delta dps1$  (ubiquinona),  $\Delta C26H8.12$  (citocromo C),  $\Delta cox6$  (complejo IV) y  $\Delta C1071.11$  (NADH DH) se crecieron en medio líquido rico y el mismo numero de células ( $10\text{-}10^5$ ) se emplacó en medios sólido rico y mínimo, en condiciones aeróbicas, y en medio mínimo en condición de anaerobiosis. B. Perfil de la curva de crecimiento en medio rico de las cepas del punto A. Se recogieron los valores de absorbancia a 600nm a los tiempos indicados. C y D. Máximos valores de crecimiento de los mutantes mitocondriales tras tratamiento con cisteína o NAC. Las cepas 972 (WT) y los mutantes  $\Delta coq4$ ,  $\Delta dps1$  y  $\Delta C1071.11$  se crecieron en medio mínimo añadiendo, o no, cisteína 0,1 mg/ml o NAC 1,6 mg/ml. Se recogieron los valores de absorbancia a 600nm a los tiempos indicados.

## 2.5 Los mutantes mitocondriales presentan un elevado nivel de estrés oxidativo intrínseco

El hecho de que los mutantes en la cadena de transporte de electrones necesiten una condición de anaerobiosis o la ayuda de antioxidantes para crecer en medio mínimo nos indica que estas cepas tienen un nivel oxidativo intrínseco más elevado respecto a una cepa salvaje creciendo en el mismo medio. Supusimos que estos mutantes serían incapaces de respirar, debido a sus mutaciones en la cadena de transporte de electrones, y que el aumento de ROS intrínseco, si lo hubiera, sería causado por el mal funcionamiento de la cadena de transporte y el escape incontrolado de electrones.

Para averiguar nuestra hipótesis, en primer lugar analizamos la capacidad de consumir oxígeno, y entonces de respirar, de los mutantes mitocondriales creciendo en medio rico. Como esperábamos estas cepas consumían una cantidad de oxígeno mucho menor que la cepa salvaje (Fig. 21 A, (Zuin *et al.* 2008).

El segundo paso fue analizar la cantidad de ROS intrínseca de estas cepas respecto a la cepa salvaje. Para eso utilizamos un marcador fluorescente, el 2',5'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce fluorescencia verde detectable por citometría de flujo. Como control positivo se utilizó una cepa salvaje tratada con el inhibidor antimicina A, que bloquea la cadena de transporte de electrones incrementando la producción de ROS, y como control negativo el inhibidor 2,4-dinitrofenol, que inhibe la producción de ATP pero no causa bloqueo en el transporte de electrones y por lo tanto no aumenta los niveles de ROS (de hecho puede llegar a disminuirlos (Barros *et al.*, 2004)). Los resultados nos confirmaron que los mutantes mitocondriales tienen un nivel de ROS intrínseco mayor que la cepa salvaje, incluso en medio YE-complex (Fig. 21 B, (Zuin *et al.* 2008).



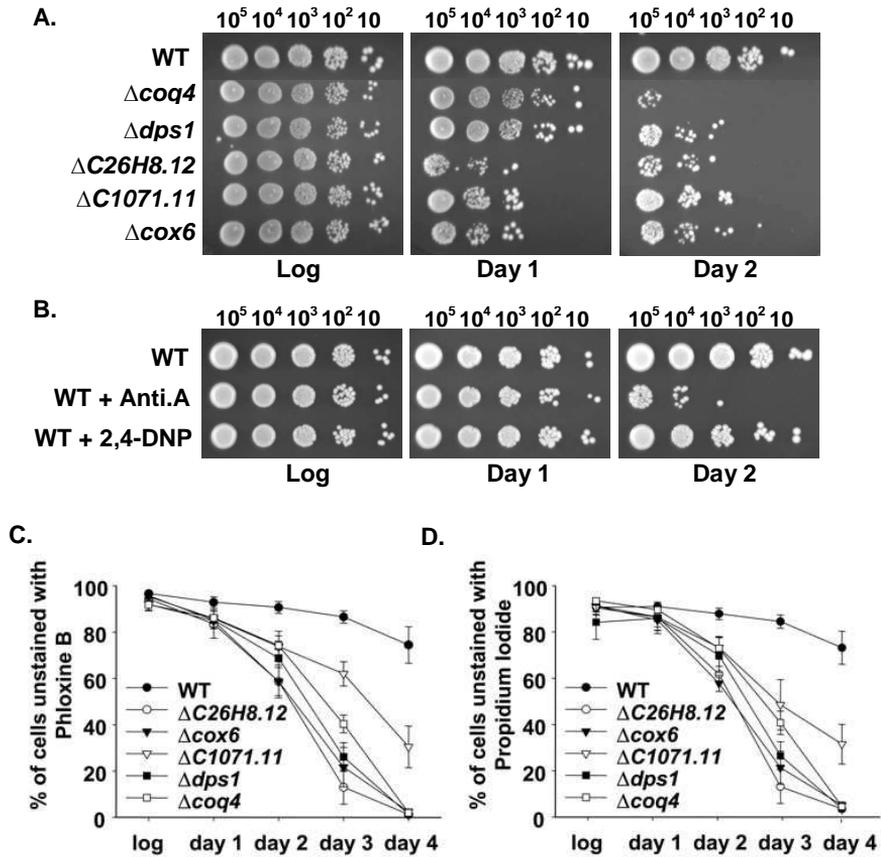
**Figura 21. Los mutantes mitocondriales presentan una deficiencia en la respiración y elevada concentración de ROS intracelulares.** A. Porcentaje del consumo de oxígeno de las cepas WT,  $\Delta coq4$ ,  $\Delta dps1$ ,  $\Delta C26H8.12$ ,  $\Delta cox6$  y  $\Delta C1071.11$  creciendo en fase exponencial en medio rico. B. Nivel de estrés oxidativo intrínseco. Las cepas del punto A se utilizaron para medir la concentración de ROS intrínseca con la técnica de la medición de fluorescencia del marcador DCFH-DA. Como controles positivo y negativo se trató la cepa salvaje con los inhibidores mitocondriales antimicina A (0,135 mg/L) o 2,4-dinitrofenol (25 mg/L), respectivamente.

## 2.6 El elevado estrés oxidativo intrínseco de los mutante mitocondriales afecta a su viabilidad en fase estacionaria

Sabiendo que los mutantes en la cadena de transporte de electrones tenían más estrés oxidativo intrínseco quisimos averiguar si esto afectaba al envejecimiento cronológico de estas cepas. El primer paso fue analizar la viabilidad en fase estacionaria. Para eso, para cada cepa, utilizamos un cultivo líquido de medio rico y lo mantuvimos desde la fase logarítmica hasta que hubieran pasado 48 horas de fase estacionaria. Recogimos parte del cultivo durante la fase exponencial, a las 24 y a las 48 horas de fase estacionaria, en los tres momentos emplacamos la misma cantidad de células, con diluciones seriales, en placas de medio rico. Los resultados indicaban que la elevada concentración de ROS de los mutantes afectaba a la viabilidad en fase estacionaria (Fig. 22 A, (Zuin *et al.* 2008). Como control hicimos el mismo experimento comparando una cepa salvaje creciendo en medio mínimo y tratada, o no, con los inhibidores antimicina A y 2,4-dinitrofenol. Los resultados nos confirmaron

que la falta de viabilidad era debida al bloqueo de la respiración y a su consecuente incremento de ROS (Fig. 22 B, (Zuin *et al.* 2008).

Finalmente, el chequeo de la actividad metabólica de los mutantes en fase estacionaria nos aportó una nueva comprobación de la falta de viabilidad de estas cepas. Gracias a la tinción con floxina B o con yoduro de propidio, que tiñen las células metabólicamente inactivas, se pudo averiguar que los mutantes mitocondriales en fase estacionaria tienen un porcentaje de inactividad metabólica mucho más elevado que una cepa salvaje (Fig. 22 C y D, (Zuin *et al.* 2008).



**Figura 22. Los mutante mitocondriales tienen un envejecimiento cronológico reducido.** A. Viabilidad de los mutantes en fase estacionaria. Las cepas 972 (WT) y los mutantes  $\Delta coq4$  y  $\Delta dps1$  (ubiquinona),  $\Delta C26H8.12$  (citocromo C),  $\Delta cox6$  (complejo IV) y  $\Delta C1071.11$  (NADH DH) se crecieron en medio líquido rico y el mismo numero de células ( $10\text{-}10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log), a las 24 (day 1) y a las 48 (day 2) horas después de haber entrado en fase estacionaria. B. La inhibición de la respiración reduce la viabilidad en fase estacionaria. La cepa salvaje 972 se creció en medio mínimo en presencia, o no, de los inhibidores antimicina A (0.135 mg/l) y 2,4-dinitrofenol (25 mg/l). El mismo numero de células ( $10\text{-}10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log), a un día (day 1) y dos días (day 2) de fase estacionaria. C y D. Los mutantes mitocondriales en fase estacionaria tienen una actividad metabólica reducida respecto a la cepa salvaje en la misma condición. Las mismas cepas del punto A se crecieron en medio rico y se incubaron con floxina B (5  $\mu\text{g/ml}$ ) o con ioduro de propidio (3  $\mu\text{g/ml}$ ). A los días indicados se midió el porcentaje de células teñidas mediante citometría de flujo.

Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, García-Santamarina S, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Ayté J, Hidalgo E.

[Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast.](#)

PLoS One. 2008 Jul 30;3(7):e2842.

### 3 PAPEL DE LA MAP QUINASA Sty1 EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO

La fase estacionaria es aquella fase de la curva de crecimiento provocada por falta de nutrientes y que se caracteriza por una parada en el ciclo mitótico, un cambio fenotípico y de la expresión génica, y una acentuada resistencia a diferentes tipos de estrés. Desde el momento en que las células entran en esta nueva fase, la duración de su viabilidad en el tiempo se describe como envejecimiento cronológico.

Debido a que la situación de fase estacionaria ocurre por la falta de nutrientes en el medio, se puede considerar esta condición como una situación de estrés. La capacidad de las células de entrar, adaptarse y mantener la viabilidad en esta fase de la curva de crecimiento requiere la activación, o inactivación, de diferentes rutas de señalización de nutrientes, como la ruta de TOR, la ruta de Pka1 y la ruta de Sty1, en el caso específico de *S. pombe*.

Decidimos orientar nuestros estudios principalmente en averiguar el papel de la quinasa Sty1 en responder a la condición de fase estacionaria. Aunque la condición de quiescencia celular ocurra por falta de diferentes tipos de nutrientes, decidimos enfocar nuestro trabajo hacia la condición de fase estacionaria por falta de glucosa.

Este bloque de resultados incluye:

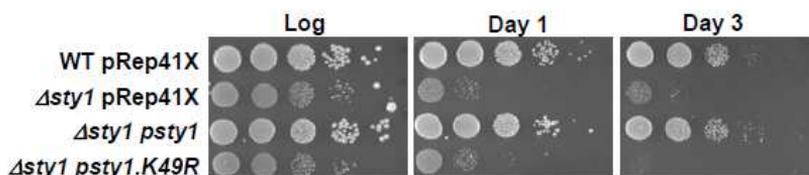
Resultados reunidos en el manuscrito: "*Life-span extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway*".

Alice Zuin, Mercè Carmona, Isabel Morales-Ivorra, Ana P. Vivancos, José Ayté and Elena Hidalgo.

Resultados no integrados en el manuscrito que complementan los resultados anteriores.

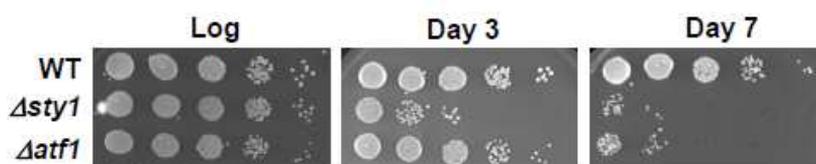
### 3.1 La actividad quinasa de Sty1 es necesaria para la supervivencia en fase estacionaria

Uno de los principales mecanismos de respuesta a estrés es la ruta de la MAP quinasa Sty1. Debido a que la condición de fase estacionaria se puede considerar un momento de estrés para la célula, quisimos averiguar si Sty1 estaba implicada en la respuesta a esta condición. Un primer paso se hizo cuando averiguamos que, al entrar en fase estacionaria, la quinasa Sty1 se fosforila, activándose, y se localiza en el núcleo, tal como hemos descrito en el apartado 1.5 de estos resultados (Zuin et al., 2005). El paso siguiente fue averiguar si Sty1 era necesario para mantener la viabilidad en esta condición. Para esto hicimos un ensayo de supervivencia en placa comparando una cepa salvaje y una cepa delecionada en *sty1* transformada con un plásmido, con promotor regulado por tiamina y de intensidad media (pRep41X). El plásmido se utilizó vacío, o incluyendo la secuencia que codifica para la quinasa Sty1, sin mutar o con la mutación K49R que da lugar a una proteína sin actividad catalítica. Averiguamos que la cepa mutada sobrevivía durante muchas menos horas que la cepa salvaje, y que la falta de viabilidad era debida a la falta de la actividad catalítica de la quinasa (Fig. 23).



**Figura 23. La viabilidad en fase estacionaria depende de la actividad catalítica de la quinasa Sty1.** La cepa salvaje 972 transformada con plásmido pRep41X vacío (WT pRep41X) y la cepa 224 ( $\Delta sty1$ ) transformada con el plásmido pRep41X vacío ( $\Delta sty1$  pRep41X), con *sty1* ( $\Delta sty1$  *psty1*) o con *sty1* mutado K49R ( $\Delta sty1$  *psty1.K49R*) se crecieron en medio mínimo líquido y el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplazó en medio sólido mínimo durante la fase logarítmica (log), a las 24 (day 1) y a las 48 (day 2) horas después de haber entrado en fase estacionaria.

Quisimos, además, averiguar la viabilidad en fase estacionaria del mayor efector de la respuesta mediada por Sty1, el factor de transcripción Atf1. En el ensayo de viabilidad resultó que las células con delección de *atf1* tenían un envejecimiento cronológico más largo que células delecionadas en *sty1* pero no eran tan viables como las de una cepa salvaje. Pudimos concluir que hay otros factores dependientes de Sty1 pero no de Atf1 necesarios para la supervivencia en fase estacionaria (Fig. 24.)

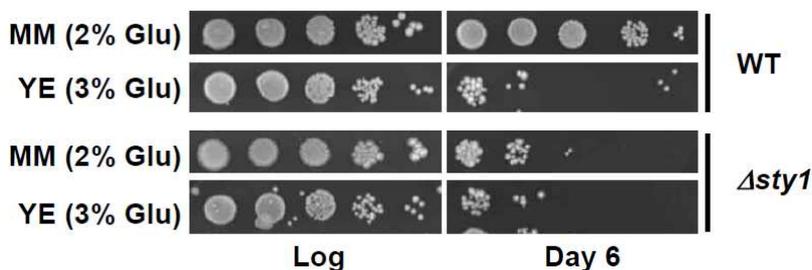


**Figura 24. La viabilidad en fase estacionaria de una cepa  $\Delta atf1$  tiene un fenotipo menos severo que el de una cepa  $\Delta sty1$ .** La cepa salvaje 972 (WT) y las cepas AV18 ( $\Delta sty1$ ) y AV25 ( $\Delta sty1$ ) se crecieron en medio mínimo líquido y el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log), a las 72 (day 3) y a las 168 (day 7) horas después de haber entrado en fase estacionaria.

### 3.2 *S. pombe* presenta una supervivencia elevada cuando crece en medio mínimo (restricción calórica), pero no en medio rico

Debido a que la entrada en fase estacionaria está relacionada con la cantidad de nutrientes en el medio, decidimos averiguar si había diferencias en la viabilidad de una cepa salvaje creciendo en los dos medios de cultivo más comunes para la levadura *S. pombe*: el medio rico (YE) y el medio mínimo (MM). El medio rico tiene una fuente de carbono más abundante que el medio mínimo porque se compone de un extracto de levadura a un porcentaje de 5 gramos/litro (que le proporciona nutrientes) y glucosa al 3%, mientras que el medio mínimo solamente tiene, como fuente de carbono, glucosa al 2%. Con una prueba de viabilidad en fase estacionaria utilizando estos dos medios resultó que

células creciendo en medio rico tenían un envejecimiento cronológico mucho más limitado que las que crecían en medio mínimo. Debido a estos resultados podemos decir que el crecimiento en medio mínimo se puede considerar como un medio de restricción calórica. La viabilidad en medio mínimo era muy afectada en la cepa  $\Delta sty1$  respecto a la salvaje, mientras que la diferencia entre las dos cepas creciendo en medio rico era casi indistinguible (Fig. 25). Concluimos que la restricción calórica aumenta la viabilidad de *S. pombe* en fase estacionaria en una forma Sty1-dependiente.

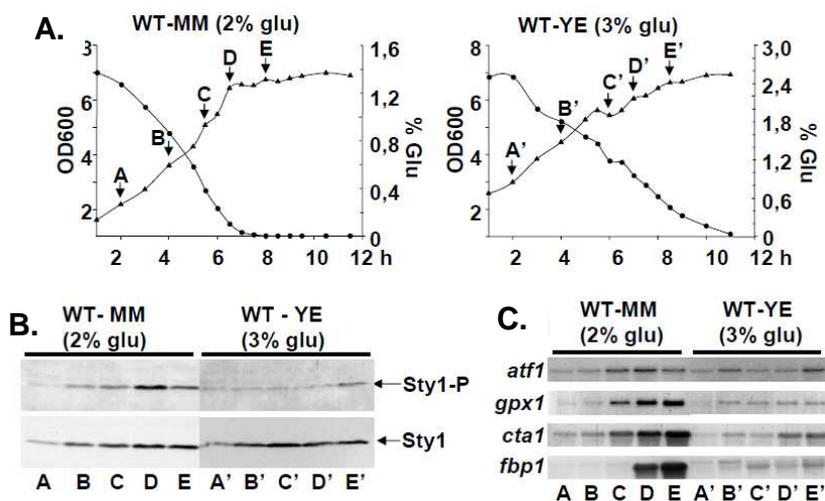


**Figura 25. La viabilidad en fase estacionaria es favorecida en medio mínimo y depende de Sty1.** La cepa salvaje 972 (WT) y la cepa AV18 ( $\Delta sty1$ ) se crecieron en medio líquido mínimo (MM (2% Glu) y rico (YE (3% Glu) líquido y el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log) y a las 144 (day 6) horas después de haber entrado en fase estacionaria.

### 3.3 Sty1 activa la respuesta a estrés por fase estacionaria solamente en condición de restricción calórica

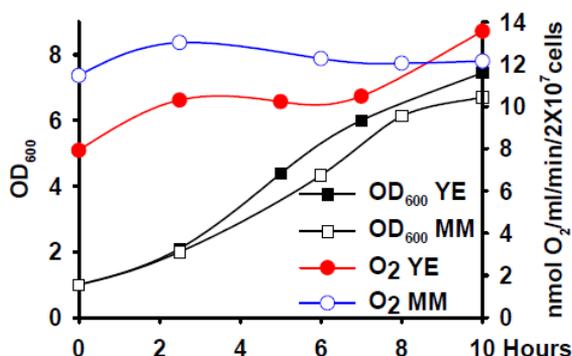
La primera vez que observamos fosforilación de Sty1 en fase estacionaria fue con células crecidas en medio mínimo. Decidimos entonces repetir el ensayo comparando una cepa salvaje creciendo en los dos medios, mínimo y rico. Para eso escogimos muestras de cultivos en cinco momentos distintos, a lo largo del crecimiento, que fueran representativos de las diferentes fases de la curva (exponencial y estacionaria) (Fig. 26 A). Con estas muestras hicimos ensayo por Western blot para averiguar la fosforilación de Sty1 y Northern blot para

confirmar la activación de la respuesta Sty1-dependiente. Como sondas para el segundo ensayo utilizamos los genes *atf1* (el mayor efector de la respuesta Sty1-dependiente y cuya transcripción se activa en respuesta a estrés en forma Sty1- y Atf1-dependiente), *gpx1* y *cta1* (glutathion peroxidasa y catalasa, necesarios para la respuesta a estrés oxidativo en forma Sty1- y Atf1-dependiente) y *fbp1* (fructosa 1-6 bifosfatasa, necesaria para la gluconeogénesis y activada en ausencia de glucosa en forma Sty1-, Atf1- y Pka1-dependiente). Los resultados nos confirmaron que la activación de Sty1, y la consecuente expresión de genes Sty1-dependientes de respuesta a estrés, solamente ocurren en condición de restricción calórica (medio mínimo, MM) (Fig. 26 B y C).



**Figura 26. La activación de Sty1 en fase estacionaria ocurre en medio mínimo pero no en medio rico.** A. Curvas de crecimiento y concentración de glucosa de una cepa salvaje en medio mínimo y rico. La cepa salvaje 972 se creció en medio mínimo (MM) y rico (YE) y se midieron la intensidad óptica (OD600) (triángulos) y el porcentaje de glucosa en el medio (% Glu) (círculos) de los dos cultivos. B. Sty1 no se activa en fase estacionaria en medio rico. A los tiempos indicados en el punto A (de A a E para MM y de A' a E' para YE) se recogieron las células y se hicieron extractos nativos para un ensayo de Western blot. Se utilizaron los anticuerpos anti-p38P (Sty1-P) y Sty1 (Sty1) como control de carga. C. La respuesta a estrés dependiente de Sty1 solamente se activa en medio mínimo. En los mismos momentos descritos en 26 B se recogieron células para extraer RNA y realizar un ensayo de Northern blot con las sondas contra los genes *atf1*, *gpx1*, *cta1*, *fbp1*.

También comprobamos que durante el crecimiento en MM se consume más oxígeno, y por lo tanto se respira más que durante el crecimiento en YE (Fig. 27).

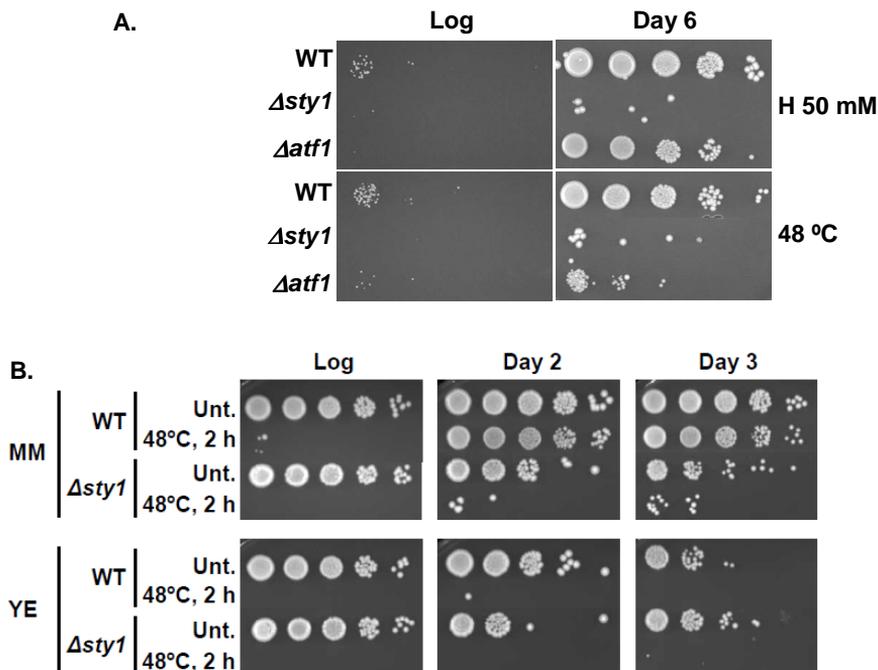


**Figura 27. Consumo de oxígeno de una cepa salvaje, creciendo con diferentes disponibilidad de nutrientes, a largo de la curva de crecimiento.** La cepa 972 se creció en medio mínimo (MM) o rico (YE). La densidad del cultivo (OD<sub>600</sub>; cuadrados) y el porcentaje de oxígeno consumido (círculos) se midieron en diferentes momentos de la curva de crecimiento.

### 3.4 La restricción calórica confiere a las células en fase estacionaria una resistencia a estrés Sty1-dependiente

Una de las características más comunes de células en fase estacionaria es una elevada resistencia a estreses medioambientales. Para confirmarlo realizamos ensayos de viabilidad en placa de cultivos celulares previamente tratados con diferentes tipos de estreses. En un primer momento analizamos solamente cultivos de medio mínimo: este primer ensayo nos confirmó que células en fase estacionaria pueden resistir a niveles de estrés significativamente superiores a los que resisten células en fase exponencial. La resistencia a estrés oxidativo resultó ser Sty1-dependiente pero no Atf1-dependiente, mientras que la resistencia a estrés por calor resultó ser Sty1- y Atf1-dependiente. Sucesivamente comparamos medio mínimo y rico para buscar posibles diferencias en la adaptación a los estreses. Una vez más resultó que el alcanzar la fase estacionaria creciendo en medio rico no es favorable para las células

porque, además de tener una viabilidad reducida, no adquieren la capacidad de resistencia a estrés (Fig. 28.).



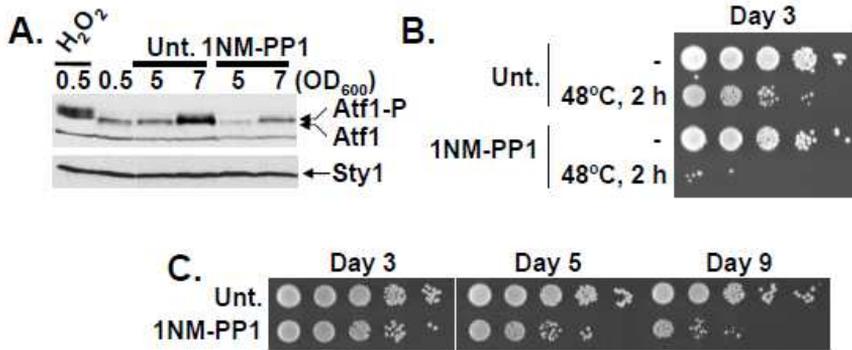
**Figura 28. La resistencia a estrés en fase estacionaria ocurre solamente en medio mínimo y de forma Sty1-dependiente.** A. Células en fase estacionaria requieren la ruta de Sty1 para adquirir resistencia a estrés. Las cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ) y AV25 ( $\Delta atf1$ ) se crecieron en medio mínimo líquido y se trataron en fase exponencial (Log) o a los 6 días de fase estacionaria (Day 6) con  $H_2O_2$  50 mM o con un choque de calor de 48 °C durante 2 horas. Después de cada tratamiento el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico. B. La resistencia a estrés depende del medio de cultivo. Las cepas 972 (WT) y AV18 ( $\Delta sty1$ ) se crecieron en medio líquido mínimo o rico y se trataron en fase exponencial (Log) o a los 2 (Day 2) y 3 (Day 3) días de fase estacionaria con un choque de calor de 48 °C durante 2 horas. Después de cada tratamiento el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico.

### 3.5 Células de *S. pombe* expresando el mutante “sensible a análogo”, Sty1.T97A, presenta defectos de viabilidad en fase estacionaria

Otra forma de estudiar la importancia de la quinasa Sty1 en los procesos de respuesta a estrés, además de deletar el gen, es obtener un mutante condicional para la actividad catalítica de la quinasa. Para hacer eso decidimos utilizar el protocolo descrito por Gregan y colaboradores que consiste en mutar un solo aminoácido en la zona de unión al ATP de la quinasa. Esta mutación deja la quinasa normalmente activa pero sensible a ciertos análogos de ATP, que se añaden al cultivo, compiten con el ATP y se unen al bolsillo de la quinasa mutada, inactivándola (Gregan et al., 2007). En nuestro caso, la mutación descrita necesaria para inactivar a Sty1 era la T97A y el análogo del ATP utilizado fue el 1NM-PP1 (Calbiochem).

Con este mutante decidimos confirmar que la activación de Sty1 es esencial para la supervivencia en fase estacionaria. Para hacer esto, crecimos en medio mínimo la cepa con la mutación T97A y recogimos células en dos momentos de la parte final de la curva de crecimiento ( $OD_{600}$  5 y 7) donde ocurre el shift a la fase estacionaria y la activación de Sty1. Obtuvimos extractos de TCA y analizamos por Western blot la fosforilación de Atf1, dependiente de la activación de Sty1. Confirmamos que Sty1 se activa al entrar en fase estacionaria y que la inactivación de su capacidad catalítica no permite la activación de la respuesta a estrés (Fig. 29 A).

Observamos, además, que la cepa con Sty1 catalíticamente inactivo por la presencia del análogo pierde viabilidad y resistencia a estrés en fase estacionaria, confirmando la importancia de la actividad de la MAP quinasa en respuesta a esta condición (Fig. 29 B y C).



**Figura 29. El tratamiento con 1NM-PP1 en la cepa con una mutación sensible al análogo para Sty1 confirma el papel de la quinasa en la respuesta frente a fase estacionaria.** A. El análogo 1NM-PP1 en la cepa con la mutación *sty1.T97A* inhibe la fosforilación del factor de transcripción Sty1-dependiente Atf1 en fase estacionaria. La cepa NG52 (*sty1.T97A*) se creció en MM y a OD<sub>600</sub> 4 se añadió, o no, el análogo 1NM-PP1 10  $\mu$ M. Sucesivamente se recogieron muestras de células, tanto del cultivo tratado como no, a OD<sub>600</sub> 5 y 7. Con estas muestras se obtuvieron extractos de TCA para un ensayo de WB con el anticuerpo para Atf1 que muestra tanto la forma fosforilada, que tiene una menor movilidad (Atf1-P), como la no fosforilada. Una muestra del cultivo sin análogo en fase logarítmica, tratada o no durante 10 min con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se utilizó como control positivo y negativo de fosforilación, respectivamente. El anticuerpo anti-Sty1 se utilizó para cuantificar. B y C. La inactivación de Sty1 reduce la resistencia a estrés y la viabilidad en fase estacionaria. La misma cepa del punto A, tratada con el análogo 1NM-PP1, se trató a los 3 días (Day 3) de fase estacionaria con un choque de calor de 48 °C durante 2 horas. Después del tratamiento el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico. Para el ensayo de viabilidad la misma cepa se emplacó a los 3 (Day 3), 5 (Day 5) y 9 (Day 9) días de fase estacionaria, en medio sólido.

### 3.6 La inactivación de las rutas de señalización de nutrientes en *S. pombe* induce un aumento de la esperanza de vida en una forma Sty1-dependiente

Las rutas que más se han descrito como las reguladoras del envejecimiento cronológico en *S. cerevisiae* son la ruta PKA y TOR, además de un posible papel de la sirtuina Sir2. En concreto, el grupo de Rokeach describió en el 2006 que la delección de los genes de las quinasas Pka1 y Sck2 (posible sustrato de TOR) aumenta la esperanza de vida en *S. pombe* (Roux et al., 2006). Quisimos entonces averiguar el papel de estas ruta en la adaptación a la fase estacionaria en la levadura *S. pombe*, y su relación con la ruta de estrés Sty1-dependiente.

Debido a que la inactivación de las rutas PKA y TOR tiene como efecto que las células sensen continuamente una falta de nutrientes, aunque crezcan en presencia de fuente de carbono, supusimos que el fenotipo en fase estacionaria de cepas con estas deleciones sería parecido al de una cepa salvaje creciendo en medio mínimo (donde hay escasez de nutrientes). Para decirlo de otra forma, estas cepas en medio rico deberían tener una viabilidad en fase estacionaria más alargada que la de una cepa salvaje creciendo en el mismo medio. Para comprobarlo utilizamos una cepa delecionada en el gen *pka1* para la ruta de Pka1 y en el gen *sck2*, homólogo a *SCH9* de *S. cerevisiae*, para la ruta TOR.

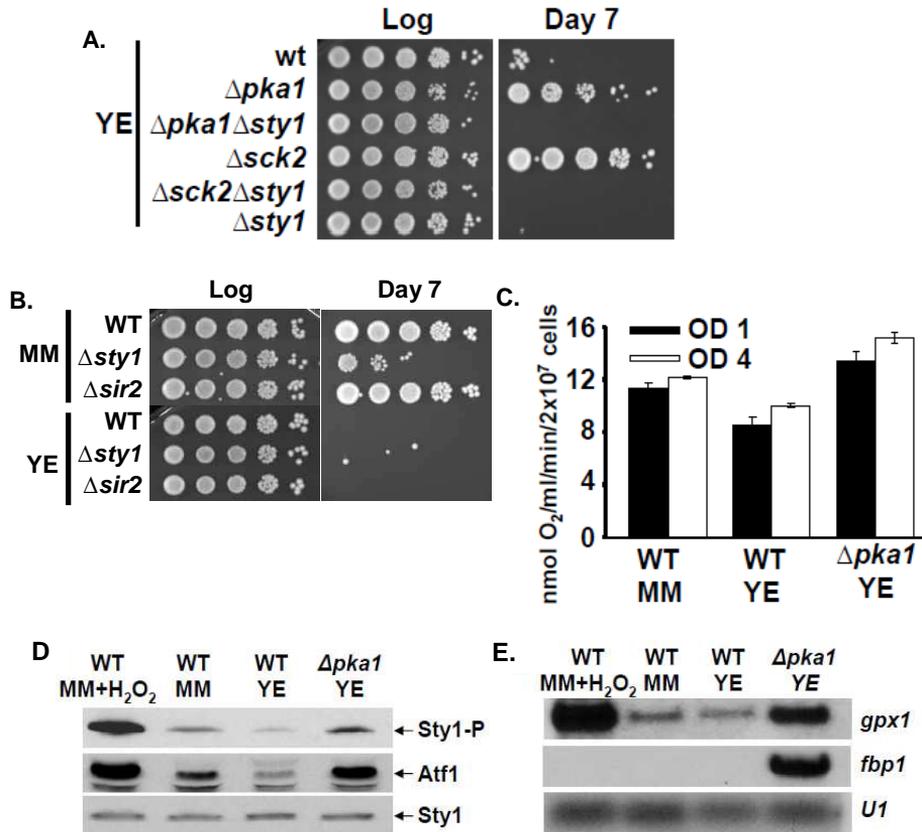
El resultado del ensayo de viabilidad en placa nos confirmó que la deleción del gen *pka1* o *sck2* permite un envejecimiento cronológico en medio rico más largo respecto al de una cepa salvaje. Esta ganancia de viabilidad es dependiente de Sty1 (Fig. 30 A).

Respecto a las sirtuinas, está descrito que una deleción en el gen *SIR2* alarga el envejecimiento cronológico en *S. cerevisiae* (Fabrizio et al., 2005). Quisimos entonces averiguar si lo mismo pasaba en *S. pombe*. No observamos ninguna diferencia con respecto a la viabilidad de la cepa salvaje, en ninguno de los dos medios (Fig. 30 B).

Sabiendo que hay diferencia en el porcentaje de consumo de oxígeno entre una cepa salvaje creciendo en medio rico o en medio mínimo, quisimos averiguar cuál era el perfil de consumo de oxígeno de las cepas  $\Delta pka1$  y  $\Delta sck2$  creciendo en fase logarítmica en medio rico. El consumo de oxígeno de la cepa  $\Delta sck2$  en medio rico era parecido al de una cepa salvaje creciendo en el mismo medio a una  $OD_{600}$  de aproximadamente 1. Sin embargo, la cepa  $\Delta pka1$  consumía más oxígeno, incluso más que la cepa salvaje creciendo en medio mínimo (Fig. 30 C).

Finalmente, observamos que en la cepa  $\Delta pka1$ , Sty1 está fosforilado y su factor de transcripción, Atf1, también está más activo respecto a una cepa salvaje creciendo en el mismo medio (Fig. 30 D). Sabiendo que en una cepa  $\Delta pka1$  hay una expresión constitutiva del gen *fbp1*, que se activa normalmente frente a falta de glucosa, realizamos un ensayo de

Northern blot para corroborar esta información y chequeamos, además, la expresión de *gpx1* como gen de respuesta a estrés Sty1-dependiente. Confirmamos la información sobre la expresión de *fbp1* y descubrimos que la respuesta Sty1-dependiente es constitutivamente activa en la cepa  $\Delta pka1$  (Fig. 30 E).

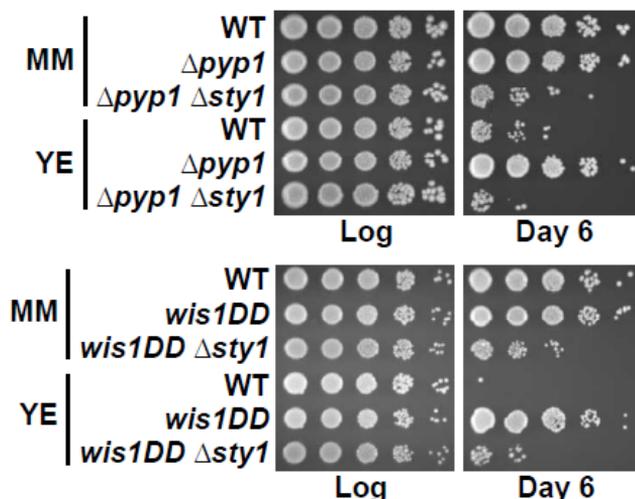


**Figura 30. Una cepa  $\Delta pka1$  creciendo en medio rico tiene, respecto a una cepa salvaje, mayor viabilidad, mayor consumo de oxígeno y la ruta de Sty1 activada.**

A. La falta de Sck2 o Pka1 alarga la vida de células creciendo en medio rico de forma Sty1-dependiente. Las cepas 972 (WT), MC22 ( $\Delta pka1$ ), MC24 ( $\Delta pka1\Delta sty1$ ), MC25 ( $\Delta sck2$ ), MC27 ( $\Delta sck2\Delta sty1$ ) y AV18 ( $\Delta sty1$ ) se crecieron en medio líquido rico (YE) y el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log) y a las 168 (day 7) horas después de haber entrado en fase estacionaria. B. La delección de *sir2* no varía la viabilidad de la cepa salvaje en fase estacionaria. Las cepas 972 (WT), AV18 ( $\Delta sty1$ ) y AZ95 ( $\Delta sir2$ ) se crecieron en medio líquido rico (YE) y el mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log) y a las 168 (day 7) horas después de haber entrado en fase estacionaria. C. Consumo de oxígeno de las cepas WT y  $\Delta pka1$ . El consumo de oxígeno de la cepa salvaje 972, creciendo en medio mínimo (MM) y rico (YE), y de la cepa MC22 ( $\Delta pka1$ ) creciendo en medio rico se determinó a las OD<sub>600</sub> 1 y 4. D. En la cepa  $\Delta pka1$  Sty1 es constitutivamente activo y hay un incremento en la cantidad de Atf1. Western blot análisis de la cepa salvaje 972, creciendo en fase exponencial en medio mínimo y rico, y  $\Delta pka1$  creciendo en medio rico. Se utilizaron los anticuerpos para p38P (Sty1-P), para Atf1 y Sty1. Como control positivo se utilizó un tratamiento con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min. de la cepa 972 en MM. E. La respuesta Sty1-dependiente es activada en una cepa  $\Delta pka1$ . Northern blot análisis de RNA de las cepas del punto D. Se utilizaron sondas para los genes *gpx1*, *fbp1* y *U1* para cuantificar. Un tratamiento con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 min de la cepa 972 en medio mínimo se utilizó como control positivo.

### 3.7 La activación constitutiva de Sty1 mejora el envejecimiento cronológico en medio rico

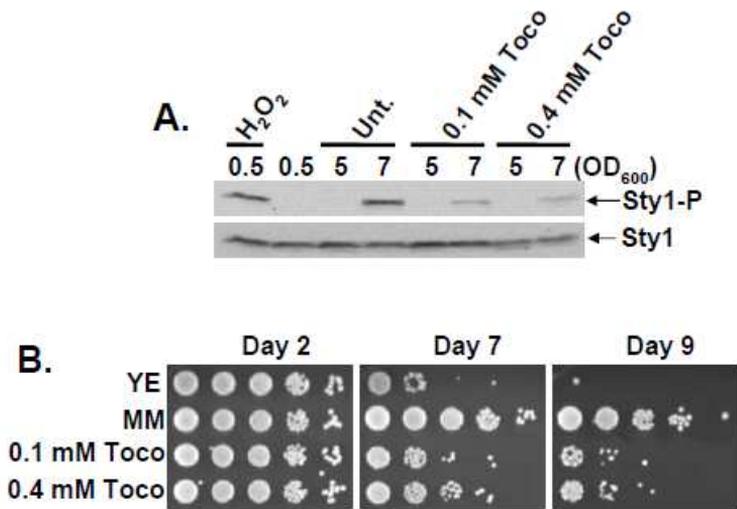
Si la larga viabilidad en fase estacionaria del crecimiento en medio mínimo depende de la activación de Sty1, hipotetizamos que una cepa salvaje creciendo en medio rico, donde normalmente no se activa Sty1, pudiera mejorar su envejecimiento cronológico con mutaciones que rindieran constitutivamente activa la ruta de la MAP quinasa. Para testar esta hipótesis realizamos un ensayo de viabilidad en placa de una cepa delecionada en el gen *pyp1*, una de las fosfatasa de Sty1, o de una cepa que tuviera la MAP quinasa quinasa Wis1, activadora de Sty1, constitutivamente activa (mutación *Wis1DD*). En ambas cepas la quinasa Sty1 queda constitutivamente activada (Samejima et al., 1997; Shiozaki and Russell, 1995; Shiozaki et al., 1998). El resultado de este ensayo confirmó nuestra hipótesis: las cepas mutadas tenían mejor viabilidad en medio rico que la cepa salvaje. Este fenotipo resultó ser Sty1-dependiente (Fig. 31).



**Figura 31. La activación constitutiva de Sty1 en medio rico confiere a las células un envejecimiento cronológico parecido al que se obtiene con la restricción calórica.** Las cepas 972 (WT), AZ103 ( $\Delta pyp1$ ), AZ104 ( $\Delta pyp1 \Delta sty1$ ), AZ98 (*wis1DD*) y AZ102 (*wis1DD \Delta sty1*) se crecieron en medio líquido rico y mínimo. El mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log) y a las 144 horas (day 6) después de haber entrado en fase estacionaria.

### 3.8 La activación de Sty1 en fase estacionaria es debida a la producción de ROS

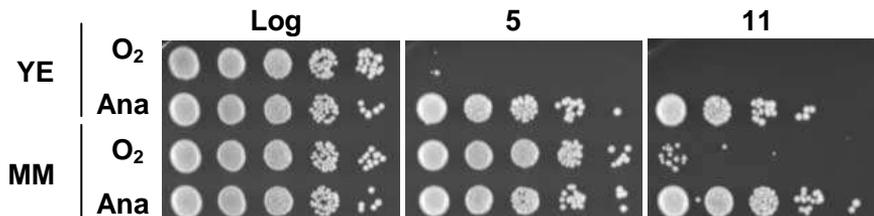
Si la causa de la activación de Sty1 en fase estacionaria, tanto en una cepa salvaje en medio mínimo como en una cepa  $\Delta pka1$  en medio rico, es el aumento de ROS debido al incremento de consumo de oxígeno, podríamos inactivar la activación de Sty1 y acortar el envejecimiento cronológico utilizando antioxidantes que disminuyan los niveles de ROS. Para confirmar esta hipótesis crecimos una cepa salvaje en medio mínimo y, antes del “shift” a fase estacionaria ( $OD_{600}$  2.5), añadimos el antioxidante tocoferol (o vitamina E) a dos distintas concentraciones. Observamos la fosforilación de Sty1 y la viabilidad en fase estacionaria tras este tratamiento y pudimos confirmar que, al entrar en fase estacionaria, Sty1 se fosforila en el cultivo de medio mínimo, pero no se fosforila en medio rico y en el medio mínimo tratado con antioxidante (Fig. 32 A). En esta ultima condición, la viabilidad de los cultivos en fase estacionaria resultó comprometida, aunque no llegó a ser tan baja como la de cultivos crecidos en medio rico (Fig. 32 B)



**Figura 32. El antioxidante tocoferol inhibe la fosforilación de Sty1 y afecta al envejecimiento cronológico en medio mínimo.** A. Sty1 no se fosforila en fase estacionaria en un cultivo en medio mínimo tratado con tocoferol. La cepa salvaje 972 se creció en medio mínimo y a  $OD_{600}$  2,5 se trató, o no, con tocoferol 0.1 mM o 0.4 mM. Sucesivamente se recogieron muestras de células, tanto del cultivo tratado como no, a  $OD_{600}$  5 y 7. Con estas muestras se obtuvieron extractos de TCA para un ensayo de WB con el anticuerpo para p38-P (Sty1-P). Una muestra del cultivo sin tratar en fase logarítmica, tratada ( $H_2O_2$  0.5) o no (0.5) durante 10 min con 1 mM  $H_2O_2$ , se utilizó como control positivo y negativo de fosforilación, respectivamente. El anticuerpo anti-Sty1 se utilizó para cuantificar. B. El antioxidante tocoferol reduce la viabilidad en fase estacionaria. Los cultivos del punto A se utilizaron para un ensayo de viabilidad en placa. El mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log) y a los 2, 7 y 9 días después de haber entrado en fase estacionaria.

Otra forma de evitar la producción de ROS es inhibir por completo la respiración creciendo las células en condiciones anaeróbicas. Para averiguar que efecto tenía la condición de falta de oxígeno sobre el envejecimiento cronológico, crecimos una cepa salvaje en medio líquido mínimo o rico, en condiciones anaeróbicas o aeróbicas. El tratamiento de anaerobiosis no provocó una disminución de la viabilidad de la cepa en medio mínimo por falta de producción de ROS sino que la favoreció, como favoreció la de la cepa en medio rico. Llegamos a la conclusión que la condición de fase estacionaria de un cultivo anaeróbico favorece el envejecimiento cronológico, tanto en condiciones de restricción calórica

como no, y que este modelo es difícilmente comparable con el modelo aeróbico (Fig. 33).



**Figura 33. El crecimiento en condiciones de anaerobiosis permite un envejecimiento cronológico más largo.** La cepa salvaje 972 se creció en medio mínimo y en medio rico, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. El mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplacó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (log) y a los 5 y 11 días después de haber entrado en fase estacionaria.

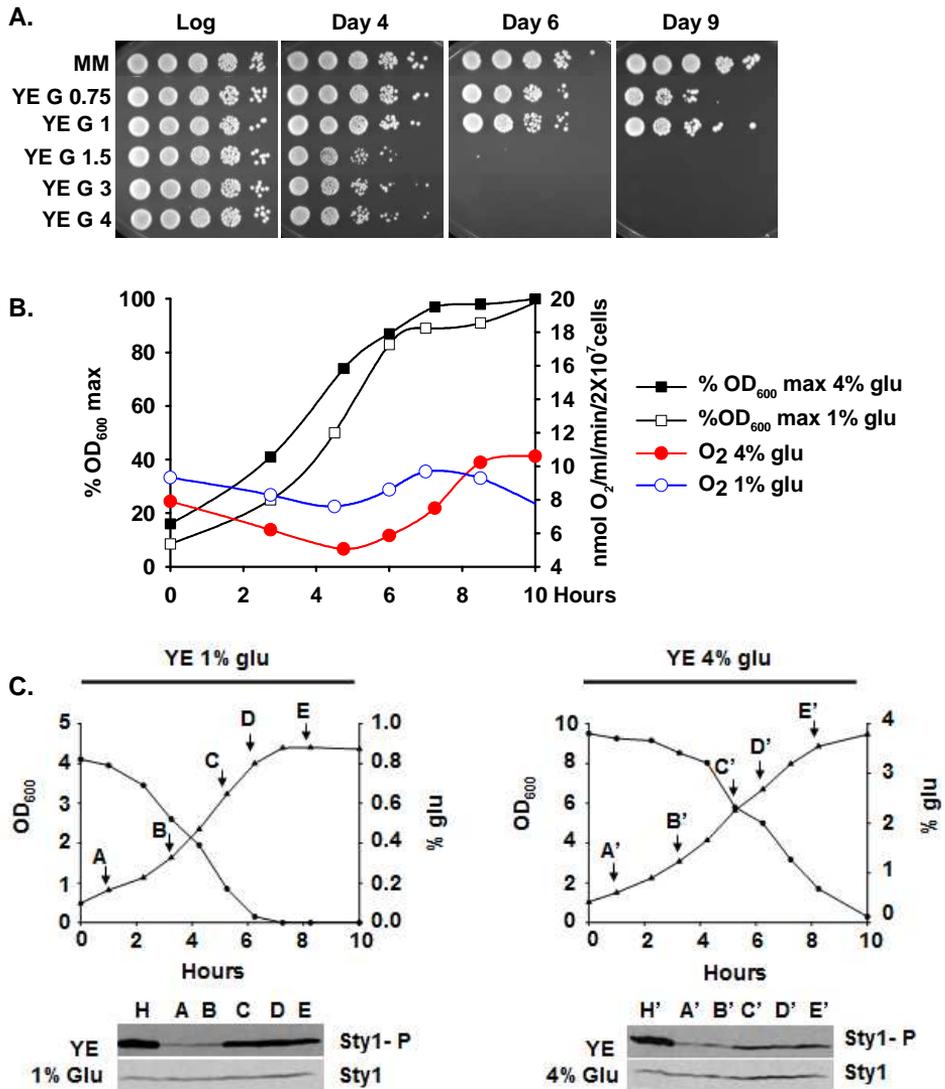
### 3.9 La condición de fase estacionaria en medio mínimo es reproducible disminuyendo la concentración de glucosa del medio rico

Otra forma de corroborar que la concentración de nutrientes del medio es importante para la viabilidad en fase estacionaria es reproducir los experimentos obtenidos con el medio mínimo utilizando un medio rico con menor porcentaje de glucosa. Para hacer esto, lo primero fue averiguar cual era el porcentaje de glucosa que podría ser considerado una restricción calórica.

Realizamos entonces un ensayo de viabilidad de una cepa salvaje creciendo en medio rico pero con distintas concentraciones de glucosa diferentes al 3% estándar. Las concentraciones de 0,75% y 1% glucosa fueron las que nos dieron el fenotipo más parecido al de medio mínimo, aunque la viabilidad resultó ser un poco menor (Fig. 34 A).

Lo siguiente fue comparar el consumo de oxígeno de dos cepas creciendo en medios ricos con distintas concentraciones de glucosa: escogimos 1% y 4%. También este resultado nos confirmó que bajas concentraciones de glucosa favorecen la respiración. (Fig. 34 B).

Finalmente, analizamos el estado de fosforilación de Sty1 al entrar en fase estacionaria en los mismos medios utilizados para el ensayo de consumo de oxígeno. Sty1 resultó fosforilarse frente a fase estacionaria en medio rico 1% glucosa pero no en 4% glucosa (Fig. 34 C).



**Figura 34. Un medio rico con menor concentración de glucosa dona una respuesta, frente a fase estacionaria, parecida a la del medio mínimo.** A. La viabilidad en fase estacionaria en medio rico depende de la concentración de glucosa. La cepa salvaje 972 se creció en medio mínimo (MM) y en medio rico con diferentes concentraciones de glucosa (YE G 0.75; YE G 1; YE G 1.5; YE G 3; YE G 4). El mismo número de células ( $10 \cdot 10^5$ ) se emplazó en medio sólido rico durante la fase logarítmica (Log) y a los 4, 6 y 9 días después de haber entrado en fase estacionaria. B. Consumo de oxígeno de una cepa salvaje, creciendo con diferentes disponibilidad de nutrientes, a largo de la curva de crecimiento. La cepa 972 se creció en medio o rico con 1% glucosa (1% glu) o 4% glucosa (4% glu). La densidad del cultivo ( $OD_{600}$ ; cuadrados) y el porcentaje de oxígeno consumido (círculos) se midieron en diferentes momentos de la curva de crecimiento. C. La concentración de glucosa en medio rico influye sobre la fosforilación de *sty1* en fase estacionaria. A los tiempos indicados (de A a E para YE 1% glu y de A' a E' para YE 4% glu) se recogieron las células y se hicieron extractos de TCA para un ensayo de Western blot. Se utilizaron los anticuerpos anti-p38P (Sty1-P) y Sty1 (Sty1) como control de carga.

Zuin A, Carmona M, Morales-Ivorra I,  
Gabrielli N, Vivancos AP, Ayté J, Hidalgo E.  
[\*Lifespan extension by calorie restriction  
relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway.\*](#)  
EMBO J. 2010 Mar 3;29(5):981-91.

**Life-span extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway**

Alice Zuin, Mercè Carmona, Isabel Morales-Ivorra, Ana P. Vivancos<sup>1</sup>, José Ayté  
and Elena Hidalgo\*

Oxidative Stress and Cell Cycle Group, Universitat Pompeu Fabra, C/ Dr. Aiguader 88, 08003  
Barcelona, Spain

<sup>1</sup>Present address: Centre for Genomic Regulation, C/ Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [elena.hidalgo@upf.edu](mailto:elena.hidalgo@upf.edu); Tel. 34-  
93-316-0848; Fax. 34-93-316-0901

Character count: 25,754

Running title: MAP kinase activation promotes longevity

Subject Categories: Cellular Metabolism / Signal Transduction

## **ABSTRACT**

Either calorie restriction, loss of function of the nutrient-dependent TOR/SCH9 or PKA pathways, or activation of stress defences improves longevity in different eukaryotes. However, the molecular links between glucose depletion, nutrient-dependent pathways and stress responses are unknown. Here we show that either calorie restriction or inactivation of nutrient-dependent pathways induces life-span extension in fission yeast, and that such effect is dependent on the activation of the stress-dependent Sty1 MAP kinase. During transition to stationary phase in glucose-depleted conditions, Sty1 becomes activated and triggers a transcriptional stress program, whereas such activation does not occur under glucose-rich conditions. Deletion of the genes coding for the SCH9-homologue Sck2 or the Pka1 kinase, or mutations leading to constitutive activation of the Sty1 stress pathway increase life span under glucose-rich conditions, and importantly such beneficial effects depend ultimately on Sty1. Furthermore, cells lacking Pka1 display enhanced oxygen consumption and Sty1 activation under calorie restriction. We conclude that calorie restriction favours oxidative metabolism, reactive oxygen species production and Sty1 activation, and this stress pathway triggers the physiological trends of long-lived cells.

Keywords: aging / MAP kinase / oxidative stress / protein kinase A / Sty1

## INTRODUCTION

The molecular mechanisms that regulate cellular aging have been conserved throughout evolution, and studies with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have made it possible to identify signaling pathways and media conditions which regulate fitness and life extension (for a review, see Kaerberlein et al., 2007). In particular, chronological aging in the budding yeast has been defined as the viability of non-dividing cells after transition to the stationary phase, mimicking the aging process of non-proliferating cells in pluricellular organisms.

The aging process can be regulated both with dietary interventions and genetically (for a review, see Bishop and Guarente, 2007). Several studies have demonstrated a direct link between environmental nutrients and longevity. Thus, reducing glucose from the culture media can increase the chronological life span in yeast (Jiang et al., 2000; Reverter-Branchat et al., 2004). This situation has been referred to as dietary or calorie restriction. Several genome-wide screenings have recently made it possible to start unraveling the molecular mechanisms that underlie longevity promotion by calorie restriction. In budding yeast, two nutrient-responsive pathways, led by SCH9 (a component of the TOR pathway) and protein kinase A, seem to coordinate the cellular response to altered glucose and nitrogen levels (Fabrizio et al., 2001; Lin et al., 2002; Powers et al., 2006). Chemical or genetic inhibition of either of these two pathways leads to chronological life span, even under glucose-rich conditions. Similar results have recently been reported in *Schizosaccharomyces pombe* (Roux et al., 2009; Roux et al., 2006; Weisman and Choder, 2001). However, the downstream effectors which trigger the required biological changes have not been clearly defined.

Another genetic and environmental intervention traditionally linked to life extension is the activation of adaptive, defensive anti-stress responses (Gems and Partridge, 2008; Kaerberlein et al., 2007; Morimoto, 2008). These cellular programs, triggered upon environmental stressors,

could through gene expression prepare cells against the molecular damage associated to aging. Thus, reactive oxygen species (ROS) have been repeatedly hypothesized to trigger cellular responses meant to enhance stress defenses and probably extend life span (Kharade et al., 2005; Schulz et al., 2007). However, oxidative stress had also been postulated to be the main cause of the molecular damage associated to aging (for a review, see Muller et al., 2007). Therefore, ROS formation and accumulation have been connected to either systemic molecular damage and reduced life expectancy, or to fitness promotion and life span.

In *S. pombe*, many genetic screenings suggest that not only the cAMP-dependent Pka1 pathway but also the mitogen-activated protein (MAP) kinase Sty1 pathway participates in the maintenance of viability of starved cells (for a review, see Kronstad et al., 1998). Sty1, also known as Spc1 and Phh1, is required for, and can be activated by different types of stress conditions, including hydrogen peroxide and glucose or nitrogen starvation (for a review, see Vivancos et al., 2006). Upon any type of stress, the Sty1 kinase is phosphorylated by Wis1 and translocated to the nucleus, where it activates a battery of genes in an Atf1-dependent manner (Shiozaki and Russell, 1995; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson et al., 1996). This common environmental stress response is intended to allow survival of cells upon stress imposition, since a number of proteins facilitate repair of the damage and promote adaptation to or decrease of the insult. However, the role of Sty1 in adaptation to starvation is not known.

We show here that either low-glucose media or inactivation of the nutrient-dependent Pka1 pathway promotes life extension in fission yeast by inducing (in order of self-activating events): high respiratory rates, elevated ROS production, activation of the MAP kinase Sty1 pathway and expression of survival genes, which will promote the physiological trends of long-lived cells.

## RESULTS AND DISCUSSION

We have previously reported that Sty1 is activated at the onset of stationary phase: the MAP kinase is phosphorylated, accumulates in the nucleus and promotes the transcription of stress-dependent genes (Zuin et al., 2005). As shown in Supplementary Figure 1A, Sty1 (WT + pREP41x or  $\Delta sty1 + psty1$ ) is required to maintain viability of cultures three days after reaching stationary phase. Expression of a kinase-dead Sty1 mutant is not sufficient to enable the cells to survive at stationary phase (Supplementary Figure 1A,  $\Delta sty1 + pSty1.K49R$ ). At least some of the beneficial effects of Sty1 on survival are dependent on the downstream Atf1 transcription factor (Supplementary Figure 1B;  $\Delta atf1$ ).

In order to find out how the media composition affects the fitness of *S. pombe* cultures at stationary phase, we grew yeast in the two most commonly used glucose-containing laboratory media, MM (also known as defined medium or synthetic minimal medium, containing 2% glucose) and YE (also known as complex medium, with 3% glucose) (Alfa et al., 1993). Unlike what happened in MM, the viability of wild type cells grown in YE was severely compromised at day 3-5 after reaching the stationary phase (Figure 1A, WT). The absence of Sty1 decreased the life span of cells grown in MM, but barely impaired the already compromised viability of yeast cultures grown in YE (Figure 1A,  $\Delta sty1$ ). The Sty1-dependent improvement of life span by growth in MM could be similarly accomplished when yeast cells were grown in YE media with low (0.3%) glucose (Supplementary Figure 2). We conclude that growth in MM, which in *S. pombe* could be defined as calorie restriction, expands the life span in a Sty1-dependent manner.

We then analyzed glucose consumption and Sty1 activation during the growth of *S. pombe*. As observed in Figure 1B, the glucose is exhausted in cultures grown in MM at the time at which the maximum optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) is reached, whereas the concentration of glucose is considerably higher (around 1%) when the YE cultures reach the plateau of stationary

phase. We analyzed Sty1 phosphorylation (Figure 1C) and Sty1-dependent transcription (Figure 1D) at different points of the growth curves (A to E for MM cultures and A' to E' for YE cultures; Figure 1B). We determined that Sty1 only becomes fully activated at the onset of stationary phase when cells are grown in MM. Oxygen consumption, as an indicator of respiratory rates, is consistently higher in MM than in YE cultures all along the growth curve (Figure 2), suggesting that ROS production and ROS steady-state levels are constitutively higher in cells grown in MM. Addition of either 2,4-dinitrophenol, an uncoupler of oxidative phosphorylation which reduces ROS production at the electron transfer chain (Gonzalez-Flecha and Demple, 1995) (Supplementary Figure 3), or the antioxidant tocopherol (Supplementary Figure 4) inhibits phosphorylation of Sty1 upon calorie restriction and impairs life span promotion. Therefore, calorie restriction promotes life span through the ROS-dependent activation of the Sty1 pathway.

A classical marker of fitness upon entry of microbial cultures into the stationary phase is the exhibition of enhanced resistance to a variety of stress conditions such as heat shock (Nystrom, 2004). As shown in Figure 3, stationary phase wild type cells grown in MM can survive a severe heat shock (2 h at 48°C). This development of stress resistance is not accomplished upon growth in YE or in the absence of Sty1. We confirmed that Sty1 activation is required for both stress-resistance acquisition and life span extension in MM by constructing a strain harboring an analogue-sensitive mutant of Sty1 (Gregan et al., 2007) (*sty1.AS*; Supplementary Figure 5); addition of the ATP analogue 1NM-PP1 specifically inhibited the MAP kinase, blocked activation of the downstream transcription factor Atf1 (Supplementary Figure 5A), and impaired heat shock resistance (Supplementary Figure 5B), and viability of stationary phase cultures (Supplementary Figure 5C).

As reported for other eukaryotes, we have determined that genetic inactivation of the Pka1 or Sck2 kinases leads to life extension of *S. pombe* cells under glucose-rich conditions (Figure 4A; compare the viability of wild type YE-grown cells *versus*  $\Delta pka1$  or  $\Delta sck2$  cells at the

logarithmic phase or 7 days after reaching stationary phase). Since we have reported that life extension upon calorie restriction relies on the MAP kinase Sty1, we tested whether the beneficial effects of Sck2 or Pka1 inactivation on life span in rich media could depend on the Sty1 stress pathway. As shown in Figure 4A, the viability in stationary phase of the YE-cultures of the double mutants  $\Delta pka1 \Delta sty1$  or  $\Delta sck2 \Delta sty1$  was comparable to that of a wild type strain, indicating that inactivation of the Pka1 or Sck2 kinases prolongs the life span in a Sty1-dependent manner. Since we have shown that life extension upon calorie restriction is dependent on ROS-dependent activation of Sty1, we first wanted to test whether there is a de-repression of respiration in the  $\Delta pka1$  and/or  $\Delta sck2$  mutants grown in glucose-rich media. We compared the oxygen consumption levels of wild type,  $\Delta pka1$  and  $\Delta sck2$  cells grown in YE (rich media). Cells lacking Sck2 had respiratory rate levels similar to wild type cells (data not shown). However, cells lacking Pka1 consumed 1.5-fold the amount of oxygen of wild type cells grown in the same glucose-rich media, YE (Figure 4B). In fact, respiratory rates of cells lacking Pka1 grown in YE were even higher than those of wild type cultures under calorie restriction conditions (WT MM, Figure 4B). Upon stress activation, Sty1 becomes phosphorylated, and this active kinase phosphorylates and induces accumulation of the Atf1 transcription factor, which triggers the transcription of stress genes such as *gpx1* (Lawrence et al., 2007; Vivancos et al., 2006) (Figure 4C). As observed in Figure 4D and 4E, Sty1 phosphorylation, Atf1 protein levels and *gpx1* mRNA are proportional to the oxygen consumption levels, being higher in cells lacking Pka1 than in wild type cells.

We hypothesized that high respiratory rates, either by calorie restriction or by loss-of-function of the Pka1 kinase, would promote extended life-span through enhanced ROS production and Sty1 MAP kinase activation. We tested this by determining the viability of stationary phase YE cultures of strains displaying a constitutive activation of the Sty1 MAP kinase. Strains lacking the Sty1-phosphatase Pyp1, or expressing a mutant MAP kinase kinase, Wis1DD, have been reported to express a constitutively activated Sty1 MAP kinase (Samejima et

al., 1997; Shiozaki and Russell, 1995; Shiozaki et al., 1998) (Figure 5A). As observed in Figure 5B, the viability of YE cultures of these strains is not lost at day 6, and is comparable to that observed for wild type cells upon calorie restriction (Figure 5B, MM).

Chronological aging in eukaryotic cells has been traditionally linked to the nutrient-dependent TOR-SCH9 and PKA pathways. We show here that fission yeast can be used as a model of chronological aging, since either calorie restriction or the inactivation of the SCH9 homologue Sck2 or the Pka1 kinases leads to life extension under glucose-rich conditions. An essential conclusion from this work is that such beneficial effects are fully dependent on the Sty1 response pathway. Thus, all the pathways convey on a single stress-activated MAP kinase, its activation being essential for extended life span. The stress-dependent Sty1 pathway can be activated at stationary phase either by calorie restriction or by genetic manipulation of components of the Sty1 kinase pathways, such as its kinase Wis1 or its phosphatase Pyp1 (Supplementary Figure 6). Such activation not only contributes to the development of stress resistance of chronologically aged cultures, but also promotes viability. Our experiments suggest that conditions shown to promote respiration (such as calorie restriction or genetic inactivation of the Pka1 pathway) trigger ROS production, Sty1 activation and life span extension. The way oxidative phosphorylation is repressed by the Pka1 kinase during logarithmic growth has not been reported. In the case of *S. cerevisiae*, the protein kinase A Tpk2 seems to inhibit respiratory growth through the negative regulation of iron uptake genes (Robertson et al., 2000).

In summary, dietary or genetic interventions aimed at enhancing respiration and ROS production may extend life span in a MAP kinase Sty1-dependent fashion, which raises the possibility that p38, its mammalian orthologue, might have a similar role in higher eukaryotes controlling senescence and aging. Our results demonstrate that respiration-induced oxidative stress causes an adaptive response promoting endogenous stress

defence capacity and life extension in a MAP kinase-dependent manner. Therefore, interventions aimed at decreasing reactive oxygen species formation may not necessarily promote longevity and may rather reduce life span in eukaryotes. Accordingly, it has been recently reported that administration of antioxidants may abrogate the beneficial effects of physical exercise in healthy humans, through inhibition of the ROS-mediated activation of endogenous antioxidant capacity (Ristow et al., 2009).

## MATERIALS AND METHODS

### Growth conditions, yeast strains and plasmids

Cells were grown in YE medium (also known as complex medium, with 3% glucose) or in MM medium (also known as synthetic minimal medium or defined medium; contains 2% glucose). Culture media were prepared as described elsewhere (Alfa et al., 1993). We used the wild-type strain 972 ( $h^-$ ) (Leupold, 1970), AV18 ( $h^-$  *sty1::kanMX6*) (Zuin et al., 2005), and AV15 ( $h^-$  *atf1::kanMX6*) (Zuin et al., 2005). Strain KS2088 [ $h^-$  *sty1-HA6His(ura4<sup>+</sup>) wis1DD::12Myc(ura4<sup>+</sup>) leu1-32 ura4-D18*] was kindly provided by MA Rodríguez-Gabriel and Paul Russell (Shiozaki et al., 1998). *S. pombe* strain AZ98 [ $h^-$  *wis1DD::12myc(ura4<sup>+</sup>) ura4-D18*] was selected after crossing strain KS2088 with JA364 ( $h^+$  *ura4-D18*, our laboratory stock). In order to construct strain AZ103 ( $h^-$  *pyp1::kanMX6*), we transformed strain 972 with a linear fragment containing *pyp1::kanMX6*, as previously described (Castillo et al., 2003). In order to generate strains MC22 ( $h^-$  *pka1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32*) and MC25 ( $h^-$  *sck2::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32*), we transformed strain PN513 ( $h^-$  *leu1-32 ura4-D18*) with a linear fragment containing open reading frame (ORF)::*ura4<sup>+</sup>*; the *ura4<sup>+</sup>* cassette was designed to substitute codons 227 to 319 and 266 to 368 of the *pka1* and *sck2* ORFs, respectively. To construct the double mutant strains AZ102 [ $h^-$  *wis1DD::12myc(ura4<sup>+</sup>) sty1::natMX6 ura4-D18*], AZ104 ( $h^-$  *pyp1::kanMX6 sty1::natMX6*), MC24 ( $h^-$  *pka1::ura4<sup>+</sup> sty1::natMX6 ura4-D18 leu1-32*) and MC27 ( $h^-$  *sck2::ura4<sup>+</sup> sty1::natMX6 ura4-D18 leu1-32*), we transformed AZ98, AZ103, MC22 and MC25, respectively, with linear fragments containing *sty1::natMX6*, as previously described (Moldon et al., 2008). The ATP analogue sensitive strain NG52 ( $h^-$  *sty1.T97A::GFP::kanMX6 leu1-32*) (Zuin et al., 2005) as described before (Gregan et al., 2007). In order to specifically inhibit Sty1 kinase activity, strain NG52 was incubated with 10  $\mu$ M of the ATP analogue 1NM-PP1 (Calbiochem), which was added to the cultures at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 4. To

express a catalytically-dead Sty1 kinase (Sty1.K49R), plasmid *psty1* [pRep.41-sty1HA-6His; (Millar et al., 1995)] was mutagenized using QuikChangeSite-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) following manufacturer's Instructions.

#### **Stationary phase conditions and survival assay**

Strains were grown at 30°C in MM or YE media until they reached stationary phase, at an approximate OD<sub>600</sub> of 5–8, depending on the strains and growth conditions. When indicated (Supplementary Figure 3 and Supplementary Figure 4), the antioxidants 2,4-dinitrophenol (Sigma) (DNP; 25 or 50 mg/l) or DL- $\alpha$ -tocopherol acetate (Sigma) (100 or 400  $\mu$ M) were added to late logarithmic cultures. The same number of cells ( $10^5$  to  $10$ ) in 3  $\mu$ l was spotted on YE agar plates from cultures at the logarithmic phase (OD<sub>600</sub> of 0.5) or days after reaching the stationary phase. The spots were allowed to dry and the plates were incubated at 30° for 2–4 days. When indicated, cultures of wild type (972) and  $\Delta$ *sty1* (AV18) cells, growing in MM or YE media, were heat shocked for 48°C during 2 hours before being spotted.

#### **Preparation of native extracts**

For detection of Sty1, native extracts were obtained. Cell cultures were harvested by centrifugation. Cell pellets were washed once with distilled water and resuspended in lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% NP-40, 10% glycerol]. Glass beads were added to the cell suspensions and cells were lysed with three 30-s pulses in a bead beater (Fast Prep; Bio 101) at setting 4.5 and at 4°C. Lysates were then centrifuged to remove cell debris. The protein concentration was determined by using the Bradford protein assay (Bio-Rad). Fifty micrograms of protein extracts were separated electrophoretically by 10% SDS-PAGE and transferred to Protran nitrocellulose membranes

(Whatman). Sty1 phosphorylation was detected using commercial anti-p38P MAPK antibodies (Cell Signaling). Sty1 was immunodetected with polyclonal anti-Sty1 antibody (Jara et al., 2007).

#### **Preparation of trichloroacetic acid (TCA) extracts to detect Atf1**

In order to detect not only Sty1 but also Atf1 protein, TCA extracts were obtained as described before (Sanso et al., 2008). Atf1 and Sty1 were immunodetected with polyclonal anti-Atf1 (Sanso et al., 2008) or anti-Sty1 (Jara et al., 2007) antibodies, whereas phosphorylated Sty1 was detected with commercial anti-p38P MAPK antibodies (Cell Signaling).

#### **RNA preparation for Northern blot analysis**

RNA from cells grown in MM or YE media to the OD<sub>600</sub> indicated in the figures was isolated and Northern blot performed as described elsewhere (Vivancos et al., 2004). The blots were hybridized with labelled *atf1*, *gpx1*, *cta1* or *fbp1* ORFs. *U1* was used as a loading control.

#### **Measurement of glucose concentration**

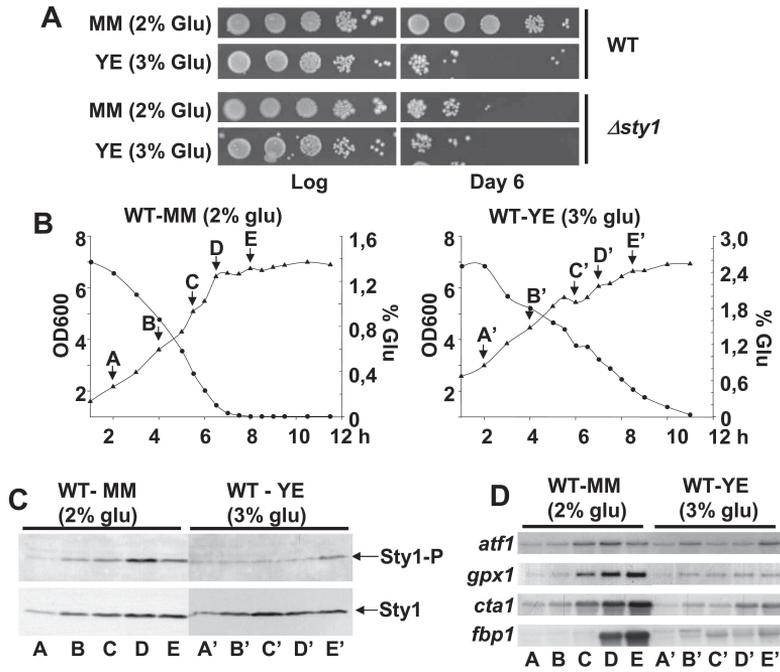
To measure the glucose concentration of a cell culture, supernatant was first obtained centrifuging 1 ml of culture to a maximum speed and then diluted 1:10 in milli Q water. This dilution was used to perform the measurement employing a commercial spectrophotometric assay kit (Cromatest-Linear).

#### **Measurement of oxygen consumption**

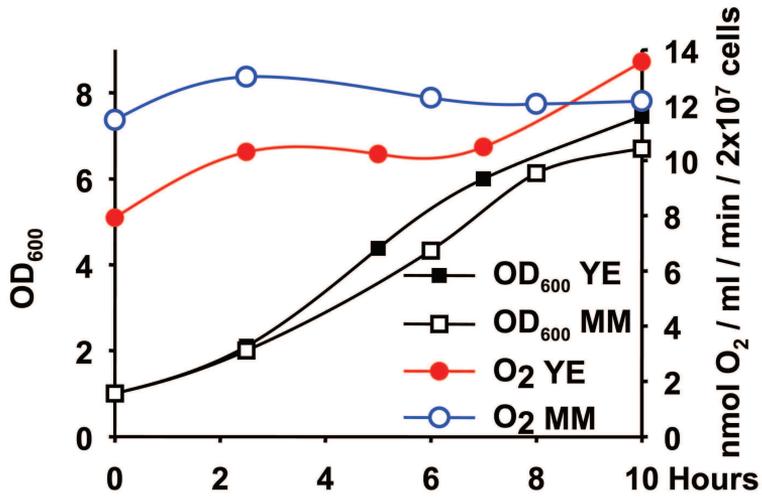
Oxygen consumption of approximately  $10^7$  cells in one ml, collected from cultures at the indicated OD<sub>600</sub>, was measured as described before (Zuin et al., 2008), but using a Hansatech Oxygraph (Hansatech), with readings being recorded during 15 minutes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

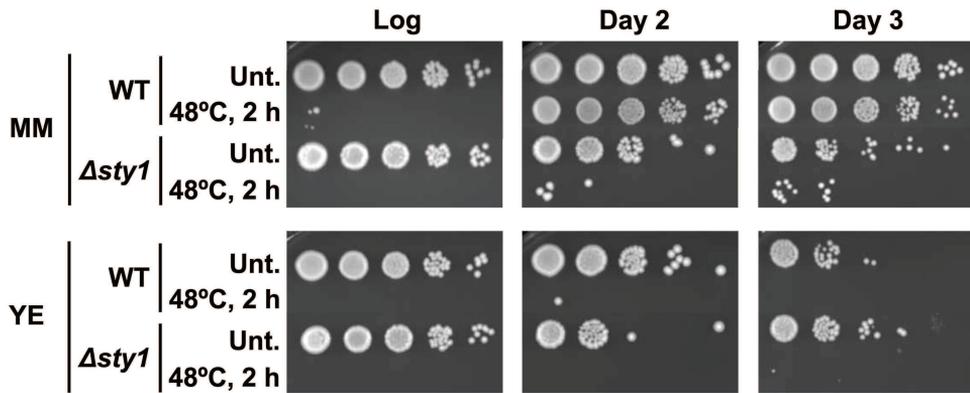
We thank members of the laboratory for helpful discussions. We are grateful to Joaquim Ros and Pura Muñoz-Canoves for helpful comments on the manuscript. We thank Paul Russell and Miguel Rodriguez-Gabriel for providing strain *wis1DD*. Regarding author contributions, A.Z. is primarily responsible for most of the experiments. .M.C., I.M.-I. and A.P.V. contributed to some of the experimental work. J.A. and E.H. guided the research, and E.H. wrote the manuscript. This work was supported by Dirección General de Investigación of Spain Grant BFU2006-02610 and by the Spanish program Consolider-Ingenio 2010 Grant CSD 2007-0020 to E.H



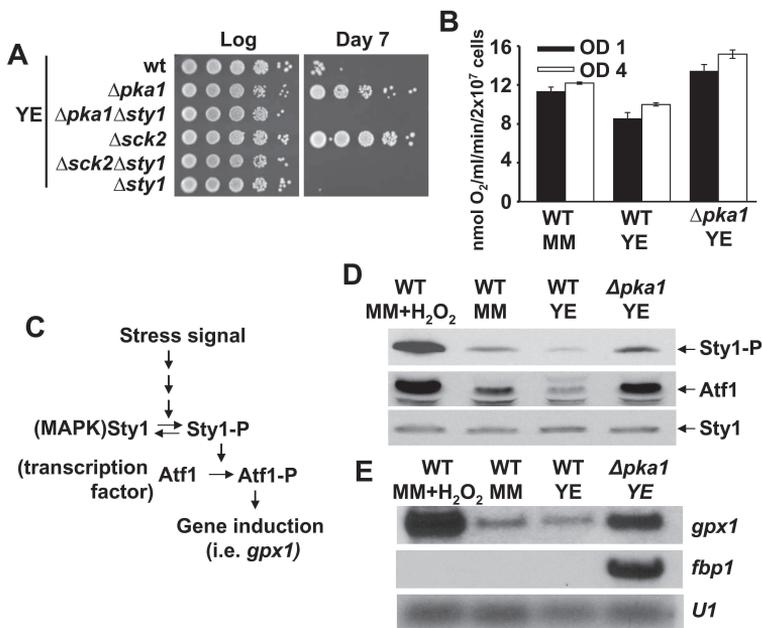
Zuin et al Figure 1



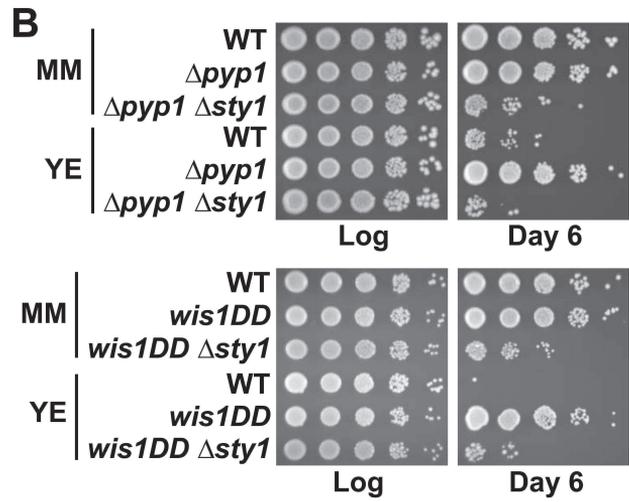
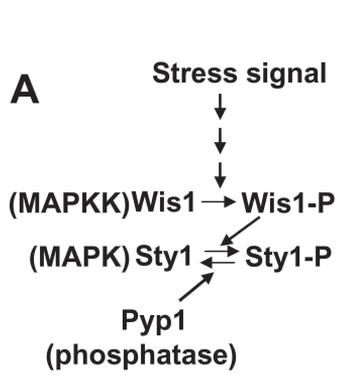
Zuin et al Figure 2



Zuin et al Figure 3



Zuin et al Figure 4



Zuin et al Figure 5

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1** Sty1-dependent life-span promotion and Sty1 activation at stationary phase only occurs upon calorie restriction. (A) Growth in minimal media (MM), but not in complex media (YE), induces life extension in a Sty1-dependent manner. Strains 972 (WT) and AV18 ( $\Delta sty1$ ) were grown in MM or YE media. Serial dilutions of cells at the logarithmic (Log) or at the stationary phase (Day 6) were spotted onto YE plates. (B) Growth curves and glucose concentrations of MM (calorie restriction) and YE (complex media) wild type cultures. Wild type strain (972) was grown in defined or complex media; OD<sub>600</sub> (triangles) and glucose concentration (circles) were recorded at the times indicated in hours (h). (C) Sty1 is not activated at stationary phase in cells grown in YE. At the time points indicated in Figure 1B (A to E for growth in MM and A' to E' for YE cultures), cells were collected, and native protein extracts were prepared. Western blot analysis using anti-p38P (Sty1-P, top panel) or anti-Sty1 antibodies as a loading control (Sty1, bottom panel). (D) Sty1-dependent gene transcription is not activated at stationary phase in cells grown in YE. RNA from the same time points as in C were obtained and hybridized with probes against *atf1*, *gpx1*, *cta1* and *fbp1*.

**Figure 2** Oxygen consumption of *S. pombe* cells is higher in MM than in YE cultures along the growth curve. Wild type strain (972) was grown in MM or YE media; OD<sub>600</sub> (squares) and oxygen consumption (circles) were recorded at different times during the growth curve.

**Figure 3** Heat shock resistance of stationary phase cells is calorie restriction- and Sty1-dependent. Strains 972 (WT) and AV18 ( $\Delta sty1$ ) were grown in defined (MM) and complex (YE) media. At logarithmic phase (Log) and 48 (Day 2) and 72 hours (Day 3) after reaching stationary phase, cells were heat shocked at 48°C during 2 hours or left untreated (Unt.). Serial dilutions of the cultures were spotted onto YE plates.

**Figure 4** Loss-of-function of the glucose-dependent Pka1 kinase triggers enhanced respiratory rates, activation of the Sty1 pathway and life extension even at high glucose concentrations (YE media). (A) Lack of the Sck2 and Pka1 kinases promote stationary phase cell survival under glucose-rich conditions in a Sty1-dependent manner. Strains 972 (WT), MC22 ( $\Delta pka1$ ), MC24 ( $\Delta pka1 \Delta sty1$ ), MC25 ( $\Delta sck2$ ), MC27 ( $\Delta sck2 \Delta sty1$ ) and AV18 ( $\Delta sty1$ ) were grown in YE media. Serial dilutions of the logarithmic (Log) and stationary phase (Day 7) cultures were spotted onto YE plates. (B) Oxygen consumption of wild type and  $\Delta pka1$  cells. Oxygen consumption of strains 972 (WT), grown in MM and YE media, and MC22 ( $\Delta pka1$ ), grown in YE, was determined at OD<sub>600</sub> 1 (white bars) and 4 (black bars). The standard error measurements (SEM) of three replicates are indicated. (C) Scheme of the stress-, Sty1-dependent activation of gene expression. (D)  $\Delta pka1$  cells display enhanced levels of phosphorylated Sty1 and increased protein levels of Atf1. Strains as in B were grown in YE or MM media, as indicated. As a control of activated Sty1, wild type cells were treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. Western blot analysis of TCA extracts is shown, using anti-p38P (Sty1-P, top panel), anti-Atf1 (Atf1, middle panel) or anti-Sty1 antibodies (Sty1, bottom panel). (E) Sty1-dependent gene transcription is constitutively activated in cells lacking Pka1. RNA from strains and conditions as in D was obtained, and probed with *gpx1* (activated by Sty1 and Atf1), *fbp1* (repressed by Pka1) and *U1* (loading control). As a control of activated Sty1, wild type cells were treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min.

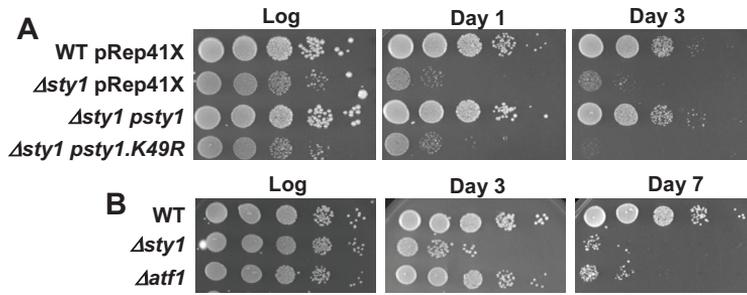
**Figure 5** Constitutively active Sty1 is sufficient to promote life extension of cells grown under glucose-rich conditions. (A) Scheme of the regulation of Sty1 phosphorylation. (B) Strains 972 (WT), AZ103 ( $\Delta pyp1$ ), AZ104 ( $\Delta pyp1 \Delta sty1$ ), AZ98 (*wis1DD*) and AZ102 (*wis1DD \Delta sty1*) were grown in MM or YE media. Serial dilutions of logarithmic (Log) and stationary phase (Day 6) cultures were spotted onto YE plates.

## REFERENCES

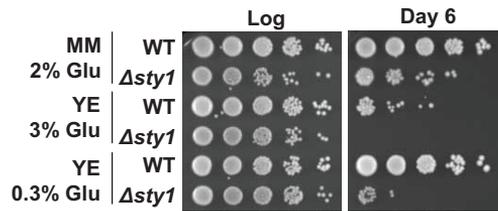
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E. (1993) *Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Bishop, N.A. and Guarente, L. (2007) Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet*, **8**, 835-844.
- Castillo, E.A., Vivancos, A.P., Jones, N., Ayte, J. and Hidalgo, E. (2003) Schizosaccharomyces pombe cells lacking the Ran-binding protein Hba1 show a multidrug resistance phenotype due to constitutive nuclear accumulation of Pap1. *J Biol Chem*, **278**, 40565-40572.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M. and Longo, V.D. (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, **292**, 288-290.
- Gems, D. and Partridge, L. (2008) Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metab*, **7**, 200-203.
- Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B. (1995) Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing Escherichia coli. *J.Biol.Chem.*, **270**, 13681-13687.
- Gregan, J., Zhang, C., Rumpf, C., Cipak, L., Li, Z., Uluocak, P., Nasmyth, K. and Shokat, K.M. (2007) Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Nat Protoc*, **2**, 2996-3000.
- Jara, M., Vivancos, A.P., Calvo, I.A., Moldon, A., Sanso, M. and Hidalgo, E. (2007) The peroxiredoxin Tpx1 is essential as a H2O2 scavenger during aerobic growth in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **18**, 2288-2295.
- Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V. and Jazwinski, S.M. (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *Faseb J*, **14**, 2135-2137.
- Kaeberlein, M., Burtner, C.R. and Kennedy, B.K. (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet*, **3**, e84.
- Kharade, S.V., Mittal, N., Das, S.P., Sinha, P. and Roy, N. (2005) Mrg19 depletion increases S. cerevisiae lifespan by augmenting ROS defence. *FEBS Lett*, **579**, 6809-6813.
- Kronstad, J., De Maria, A.D., Funnell, D., Laidlaw, R.D., Lee, N., de Sa, M.M. and Ramesh, M. (1998) Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch.Microbiol.*, **170**, 395-404.
- Lawrence, C.L., Maekawa, H., Worthington, J.L., Reiter, W., Wilkinson, C.R. and Jones, N. (2007) Regulation of Schizosaccharomyces pombe Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem*, **282**, 5160-5170.
- Leupold, U. (1970) Genetical methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol*, **4**, 169-177.
- Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R. and Guarente, L. (2002) Calorie restriction extends Saccharomyces cerevisiae lifespan by increasing respiration. *Nature*, **418**, 344-348.
- Millar, J.B., Buck, V. and Wilkinson, M.G. (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.*, **9**, 2117-2130.

- Moldon, A., Malapeira, J., Gabrielli, N., Gogol, M., Gomez-Escoda, B., Ivanova, T., Seidel, C. and Ayte, J. (2008) Promoter-driven splicing regulation in fission yeast. *Nature*, **455**, 997-1000.
- Morimoto, R.I. (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev*, **22**, 1427-1438.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A. and Van Remmen, H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*, **43**, 477-503.
- Nystrom, T. (2004) Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol*, **58**, 161-181.
- Powers, R.W., 3rd, Kaerberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K. and Fields, S. (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*, **20**, 174-184.
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. (2004) Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem*, **279**, 31983-31989.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehnopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R. and Bluher, M. (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8665-8670.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. and Fink, G.R. (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5984-5988.
- Roux, A.E., Leroux, A., Alaamery, M.A., Hoffman, C.S., Chartrand, P., Ferbeyre, G. and Rokeach, L.A. (2009) Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS Genet*, **5**, e1000408.
- Roux, A.E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G. and Rokeach, L.A. (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell*, **5**, 345-357.
- Samejima, I., Mackie, S. and Fantes, P.A. (1997) Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J*, **16**, 6162-6170.
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C. and Hidalgo, E. (2008) Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot Cell*, **7**, 826-835.
- Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M. and Ristow, M. (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab*, **6**, 280-293.
- Shiozaki, K. and Russell, P. (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature*, **378**, 739-743.
- Shiozaki, K. and Russell, P. (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev*, **10**, 2276-2288.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. and Russell, P. (1998) Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1339-1349.
- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Jones, N., Ayte, J. and Hidalgo, E. (2004) Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol*, **52**, 1427-1435.
- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sanso, M. and Hidalgo, E. (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics*, **276**, 495-502.

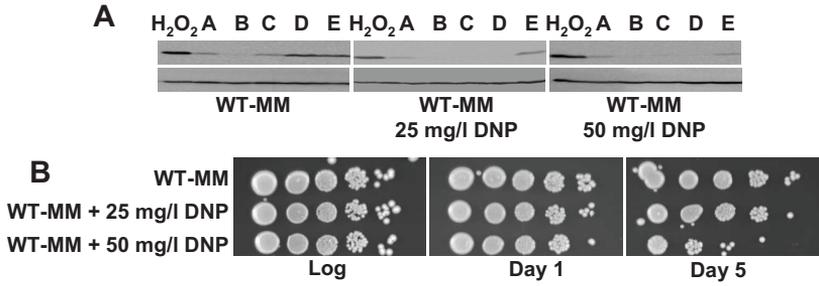
- Weisman, R. and Choder, M. (2001) The fission yeast TOR homolog, tor1+, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *J Biol.Chem.*, **276**, 7027-7032.
- Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B. and Jones, N. (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.*, **10**, 2289-2301.
- Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I.A., Garcia-Santamarina, S., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O., Hayles, J., Ayte, J. and Hidalgo, E. (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS ONE*, **3**, e2842.
- Zuin, A., Vivancos, A.P., Sanso, M., Takatsume, Y., Ayte, J., Inoue, Y. and Hidalgo, E. (2005) The glycolytic metabolite methylglyoxal activates Pap1 and Sty1 stress responses in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **280**, 36708-36713.



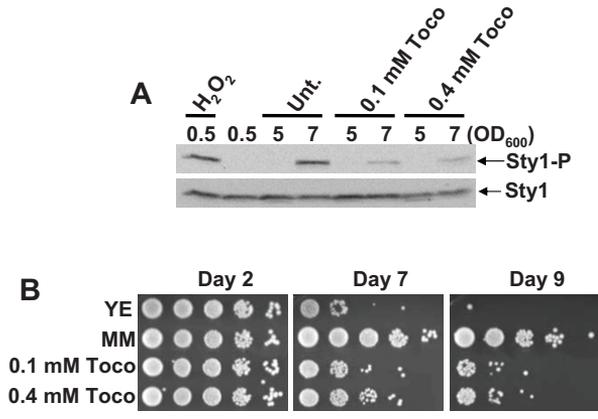
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

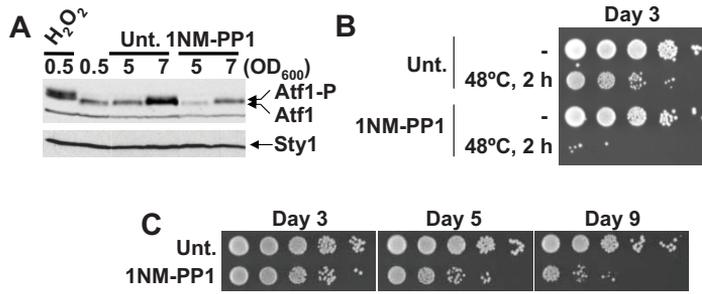


Supplementary Figure 3

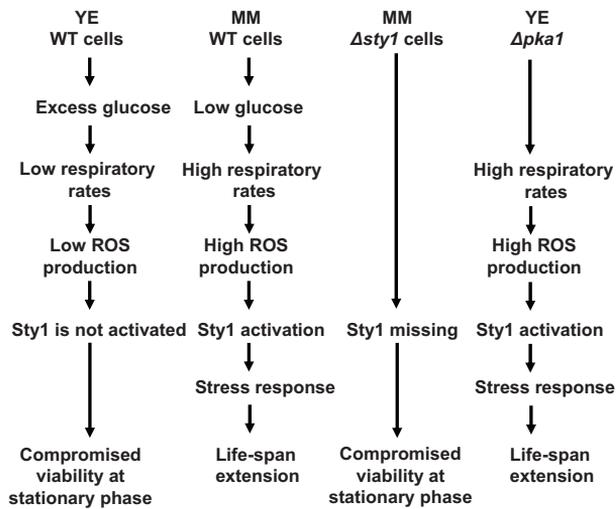


Supplementary Figure 4

Strain *sty1.T97A* (analogue sensitive)



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS (Zuin et al.)

**Supplementary Figure 1** Activation of the MAP kinase Sty1 is required to maintain viability at stationary phase. **(A and B)** An active Sty1 kinase and its downstream effector Atf1 are required for stationary phase survival. Strains 972 (WT) and AV18 ( $\Delta sty1$ ), transformed or not with an empty vector (pRep41X), *psty1* (expressing wild type Sty1) or *psty1.K49R* (expressing the catalytically-dead Sty1.K49R), and AV15 ( $\Delta atf1$ ) strains were grown in MM media. Serial dilutions of logarithmic phase cultures (Log) or after reaching stationary phase (Day 1, Day 3 or Day7) were spotted onto YE plates.

**Supplementary Figure 2** Sty1-dependent life-span promotion at stationary phase can be accomplished in YE-0.3%. Strains 972 (WT) and AV18 ( $\Delta sty1$ ) were grown in MM, YE (3% glucose) or YE with 0.3% glucose. Serial dilutions of logarithmic (Log) and stationary phase (Day 6) cultures were spotted onto YE plates.

**Supplementary Figure 3** The ATP-uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) acts as an antioxidant and inhibits Sty1 phosphorylation and life-span promotion at stationary phase in MM. **(A)** Sty1 is not phosphorylated at stationary phase in cells treated with DNP. Strain 972 (WT) was grown in MM to an  $OD_{600}$  of 2.5. Cultures were then treated or not with DNP at the indicated concentrations. Cells were collected at different time points (A to E), equivalent to those indicated in Fig. 1B. Sty1 phosphorylation and Sty1 total concentration were detected from native extracts. Point A, prior to DNP addition, is common to all the Western blot panels. As a control of activated Sty1, logarithmic cultures of wild type cells were treated with 1 mM  $H_2O_2$  for 10 min ( $H_2O_2$ ). **(B)** The antioxidant effect of DNP reduces Sty1-dependent life-span promotion. Serial dilutions of

cultures from (A) were prepared from the logarithmic (Log) and stationary phase (Day 1 and Day 5), and spotted onto YE plates.

**Supplementary Figure 4** The antioxidant tocopherol inhibits Sty1 phosphorylation and life-span promotion at stationary phase in MM. **(A)** Sty1 is not phosphorylated at stationary phase in cells treated with tocopherol. Cultures of wild type strain 972, grown in MM to an OD<sub>600</sub> of 2.5, were left untreated (Unt.) or were treated with 0.1 mM or 0.4 mM tocopherol (Toco). Cells were collected at the indicated OD<sub>600</sub>. Sty1 phosphorylation and Sty1 total concentration were detected from TCA extracts. As a control of activated Sty1, logarithmic cultures of wild type cells were treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **(B)** The antioxidant effect of tocopherol reduces Sty1-dependent life-span promotion. Serial dilutions of cultures from (A) and from YE-grown wild-type cultures were prepared after they reached stationary phase (Day 2, Day 7 and Day 9), and spotted onto YE plates.

**Supplementary Figure 5** A strain harbouring an analogue-sensitive mutant of Sty1 displays shorter viability at stationary phase upon 1NM-PP1 addition. **(A)** Addition of the ATP analogue 1NM-PP1 inhibits phosphorylation of the Sty1-dependent transcription factor Atf1 at stationary phase of a strain carrying an *sty1*-analogue sensitive allele. Cultures of strain NG52 (*sty1.T97A*), grown in MM to an OD<sub>600</sub> of 4, were left untreated (Unt.) or were treated with 10 μM of the ATP-analogue 1NM-PP1. Cells were collected at the indicated OD<sub>600</sub>. Phosphorylated (Atf1-P) and unphosphorylated Atf1, and total Sty1 were detected from TCA extracts. As a control of activated Atf1, logarithmic cultures of wild type cells were treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **(B)** Inactivation of Sty1 pathway by 1NM-PP1 impairs heat shock resistance acquisition. Three days (Day 3) after reaching stationary phase, cultures from (A) were heat shocked (48° C, 2 h) or not (-), and viability was determined by sequential spotting. **(C)** Inactivation of Sty1 pathway by 1NM-

PP1 decreases cell viability during stationary phase. Several days after reaching stationary phase (Day 3, Day 5 and Day 9), viability of cultures from (A) was assayed by sequential spotting.

**Supplementary Figure 6** Scheme depicting the role of the Sty1 pathway on life-span promotion under calorie restriction (see text for details).

## 4 METODOLOGÍA

Se incluyen las cepas y técnicas experimentales utilizadas para la obtención de los resultados presentados.

### 4.1 Cepas y plásmidos

Cepas y plásmidos utilizados en el apartado 1.

En este trabajo, tal como aparece en la tabla 2, se utilizaron las cepas salvajes 972 y HM123,  $\Delta sty1$  AV18,  $\Delta pap1$  AV25,  $\Delta att1$  AV15,  $\Delta pcr1$  MS5, así como la cepa EHH5 que expresa la proteína de fusión Sty1-GFP controlada por un promotor de fuerza intermedia. Se utilizaron, además, las cepas EHH14, EHH14.C501A, EHH14.C523A, EHH14.C532A, EHH14.C501,532A, EHH14.278A y EHH14.C501,523,532A que expresan la proteína GFP-Pap1 y los mutantes de cisteína GFP-Pap1.C501A, GFP-Pap1.C523A, GFP-Pap1.C532A, GFP-Pap1.C501,532A, GFP-Pap1.C278A y GFP-Pap1.C501,523,532A, respectivamente. Estas cepas fueron obtenidas por integración de los plásmidos p85.41x, p85.41x.C501A, p85.41x.C523A, p85.41x.C532A, p85.41x.C501,532A, p85.41x.C278A y p85.41x.C501,523,532A, respectivamente, en una cepa  $\Delta pap1$  (Tabla 3).

El plásmido pRep41-GFP-*pap1* expresa la proteína de fusión GFP-Pap1. A partir de este plásmido se construyeron los plásmidos pEH104 y pEH66 que expresan, respectivamente, la proteína GFP-Pap1 sin la región N-CRD y la proteína GFP-Pap1 cuyo NES se ha sustituido por un NES de un inhibidor de proteínas quinasas que no contiene C-CRD.

Nombre	Genotipo	Procedencia
972	<i>h-</i>	<i>Leupold, 1970</i>
HM123	<i>h- leu1</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14.C501A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1.C501A::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14.C523A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1.C523A::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14.C532A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1.C532A::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14.C501,532A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1.C523,532A::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14.C278A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1.C278A::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
EHH14.C501,523,532A	<i>h- leu1 his2 ura4 pap1::ura4-nmt::GFP:Pap1.C501,523,532A::leu1+</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
AV18	<i>h- sty1::kanMX6</i>	Este trabajo
AV25	<i>h- pap1::kanMX6</i>	Este trabajo
AV15	<i>h- atf1::kanMX6</i>	Este trabajo
MS5	<i>h- pcr1::kanMX6</i>	Este trabajo
EHH5	<i>h- leu1sty1::GFP::kanMX6</i>	Este trabajo

Nombre	Descripción	Procedencia
p85.41x	<i>pnmt41x.GFP-Pap1</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
p85.41x.C501A	<i>pnmt41x.GFP.C501A</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
p85.41x.C523A	<i>pnmt41x.GFP.C523A</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
p85.41x.C532A	<i>pnmt41x.GFP.C532A</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
p85.41x.C501,532A	<i>pnmt41x.GFP.C501,532A</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
p85.41x.C278A	<i>pnmt41x.GFP.C278A</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
p85.41x.C501,523,532A	<i>pnmt41x.GFP.C501,523,532A</i>	<i>Castillo et al.,2002</i>
pRep41- <i>GFP-pap1</i>	<i>pnmt41x.GFP-Pap1</i>	<i>Toone et al., 1998</i>
pEH104	<i>pnmt41X.GFP-Pap1ΔN-CRD</i>	Este trabajo
pEH66	<i>pnmt41X.GFP-Pap1ΔN-CRDNES<sup>PKI</sup></i>	Este trabajo

Cepas utilizadas en el apartado 2.

En este trabajo, tal como aparece en la tabla 4, se utilizaron las cepas salvajes 972,  $\Delta sty1$  AV18,  $\Delta pap1$  AV25,  $\Delta srx1$  EA38. Todas las cepas de la colección de mutantes utilizadas para el “screening” y para la caracterización contienen el gen para la resistencia a kanamicina insertado en el gen que se quiere deletar y tienen auxotrofia para los aminoácidos adenina, leucina y uracilo.

Nombre	Genotipo	Procedencia
972	<i>h-</i>	<i>Leupold, 1970</i>
AV18	<i>h- sty1::kanMX6</i>	<i>Zuin et al.,2005</i>
AV25	<i>h- pap1::kanMX6</i>	<i>Zuin et al.,2005</i>
EA38	<i>h- leu1srx1::kanMX6</i>	<i>Vivancos et al.,2005</i>

Cepas y plásmidos utilizados en el apartado 3.

En este trabajo, tal como aparece en la tabla 5, se utilizaron las cepas salvajes 972,  $\Delta sty1$  AV18,  $\Delta atf1$  AV15, *Wis1DD* AZ98, *Wis1DD* $\Delta sty1$  AZ102,  $\Delta pyp1$  AZ103,  $\Delta pyp1\Delta sty1$  AZ104,  $\Delta pka1$  MC22,  $\Delta pka1\Delta sty1$  MC24,  $\Delta sck2$  MC25,  $\Delta sck2\Delta sty1$  MC27, así como la cepa NG52 que expresa la proteína Sty1 con la mutación T97A (sensible al análogo del ATP 1NM-PP1) y que se obtuvo desde la cepa EHH5 según la técnica publicada por Gregan y colaboradores (Gregan et al., 2007).

El plásmido *pSty1* expresa, desde un promotor reprimible *nmt* de fuerza intermedia, la proteína *sty1HA-6His*. A partir de este plásmido se construyó el plásmido *psty1.K49R* que expresa la proteína mutagenizada *sty1K49RHA-6His* (Tabla 6).

Tabla 5. Cepas utilizadas		
Nombre	Genotipo	Procedencia
972	<i>h-</i>	<i>Leupold, 1970</i>
AV18	<i>h- sty1::kanMX6</i>	<i>Zuin et al., 2005</i>
AV15	<i>h- atf1::kanMX6</i>	<i>Zuin et al., 2005</i>
AZ98	<i>h- wis1DD:12myc(ura4+) ura4-D18</i>	Este trabajo
AZ102	<i>h- wis1DD:12myc(ura4+) sty1::natMX6 ura4-D18</i>	Este trabajo
AZ103	<i>h- pyp1::kanMX6</i>	Este trabajo
AZ104	<i>h- pyp1::kanMX6 sty1::natMX6</i>	Este trabajo
MC22	<i>h- pka1::ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
MC24	<i>h- pka1::ura4+ sty1::natMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
MC25	<i>h- sck2::ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
MC27	<i>h- sck2::ura4+ sty1::natMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
NG52	<i>h- sty1.T97A::GFP::kanMX6</i>	Este trabajo

Tabla 6. Plásmidos utilizados		
Nombre	Descripción	Procedencia
pRep41x	<i>pnmt41x</i>	<i>Maundrell, 1993</i>
psty1	<i>pnmt41x.sty1HA-6His</i>	<i>Millar et al., 1995</i>
psty1.K49R	<i>pnmt41x.sty1K49RHA-6His</i>	Este trabajo

## 4.2 Técnicas experimentales

### Microscopia de fluorescencia

La expresión de las proteínas Pap1 y sus mutantes fusionados a GFP fue inducida tras 17-20 h de crecimiento de las células en medio de cultivo sin tiamina. La expresión de la proteína Sty1-GFP en la cepa EHH5 es independiente de la presencia o ausencia de tiamina, ya que se encuentra regulada por el promotor de *sty1*. 25 µl de cultivo celular exponencial fueron cargados en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina.

Tras eliminar por aspiración las células no fijadas en el vidrio, se añaden 2.5  $\mu$ l de glicerol 50% y se cubren con un cubreobjetos. Para la observación de las muestras se utiliza un microscopio Nikon Eclipse E600 a 100X aumentos y se capturan las imágenes utilizando una cámara Orca II Dual Scan Cooled CCD Camera y el programa Hamamatsu AquaCosmos 2.0 (Hamamatsu).

#### Análisis de RNA

Se centrifugaron cultivos de 30 ml de *S. pombe* a OD<sub>600</sub> de 0.5 a 3000 rpm durante 3 min, se lavó el precipitado celular con H<sub>2</sub>O y se congelaron las células a -20°C. El precipitado se resuspendió en 0.4 ml de tampón AE (50 mM acetato sódico pH5.3, 10 mM EDTA pH8.0) y se le añadió SDS a una concentración final del 1%. Las proteínas y el DNA se extrajeron por adición de 0.3 ml de fenol ácido e incubación a 65°C durante 5 min. Tras enfriar las muestras, se añadió 0.3 ml de cloroformo y se separaron las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación a 13200 rpm durante 2 min. Se recuperó la fase acuosa y se procedió a una nueva extracción con 0.3 ml de cloroformo, seguida de una nueva centrifugación. El RNA de la fase acuosa se precipitó con etanol. Tras la resuspensión en H<sub>2</sub>O, se cuantificó el RNA de cada muestra a OD<sub>260</sub> y se cargaron 10  $\mu$ l en un gel de agarosa con formaldehído. Se comprobó la cantidad de RNA ribosomal de las muestras como reflejo de la carga de las mismas y se transfirió el RNA a membranas de nylon cargadas positivamente. Se hibridó la membrana con sondas específicas marcadas con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP a través de un sistema de *random priming* (Roche).

#### Extractos hervidos de proteínas

Se centrifugaron cultivos de 50 ml de *S. pombe* a OD<sub>600</sub> de 0.5. Se añadió a la muestra 200 ml de "buffer" HB (25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM b-glicerol fosfato, 15 mM P-nitro fenil fosfato, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 1% Triton X-100) al cual se le añade, antes de usar, 1 mM de DTT

y 170 mg/l de PMSF. A continuación se hirvieron durante seis minutos las muestras y seguidamente se rompieron las células por acción mecánica de "glass beads" en un *bead beatter*. (3 veces durante 30 s, intensidad 4.5, 4°C; bead beatter Fast Prep; Bio 101). Se pasaron las muestras a un nuevo tubo centrifugando un minuto a 3000 rpm y se cuantificaron los extractos mediante cuantificación por "bradford".

#### Extractos nativos de proteínas

Se centrifugaron cultivos de 50 ml de *S. pombe* a OD<sub>600</sub> de 0.5. Se añadió 250 ml de "lysis buffer" (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% NP-40, 10% glicerol) al cual se le añade, antes de usar, PMSF 100 mM 10 ml, 1M DTT 1 ml/ml e inhibidores de proteasas (leupeptina 10 mg/ml 1 ml/ml, aprotinina 10 m/ml y benzamidina 10 ml/ml), inhibidores de fosfatasa (NaF 1M 4 ml/ml, vanadato sódico 0,2 M 0,5 ml/ml). Seguidamente se rompieron las células por acción mecánica de "glass beads" en un *bead beatter*. (3 veces durante 30 s, intensidad 4.5, 4°C; bead beatter Fast Prep; Bio 101). Se pasaron las muestras a un nuevo tubo centrifugando un minuto a 3000 rpm Se repite la centrifugación añadiendo 250 ml más de "lysis buffer". Finalmente se centrifugaron las muestra 10 minutos a 13000 rpm para obtener el sobrenadante que se cuantificó por "bradford".

#### Extractos de TCA

Se recogieron 5 ml de células creciendo a OD<sub>600</sub> de 0.5, tratadas o no según indicado en cada experimento. Tras los tratamientos, se añadió al cultivo 0.55ml de TCA 100% (en concentración final 10%) y se recogieron las células por centrifugación. El precipitado celular fue transferido a un eppendorf mediante resuspensión en 1 ml de TCA al 20% de concentración, que se eliminó tras una centrifugación durante 30" a 13200 rpm. Se resuspendieron las células en TCA en concentración

12.5% y se rompieron por acción mecánica de “glass beads” en un *bead beater*. Tras la obtención de los extractos celulares, se precipitaron las proteínas por centrifugación durante 20' a 13200 rpm a 4°C y, posteriormente, se eliminaron los restos de TCA mediante lavado del precipitado proteico con 1 ml de acetona. Tras la evaporación de la acetona, se resuspendió el precipitado en tampón de alquilación (0.1 M Tris-HCl pH=8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS). Finalmente se añadió tampón de carga, se hirvieron las muestras y se realizó la electroforesis. En el caso de la obtención de extractos de TCA para la determinación del estado redox *in vivo* de Pap1, se añadió al tampón de alquilación iodoacetamida en concentración 75 mM y se incubó 15 min a 25°C para permitir la alquilación de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas. Posteriormente, se diluyeron las muestras 1:5 en tampón de defosforilación hasta una concentración final de 80 mM Tris-HCl, pH 9.5, 0.08 mM EDTA y se trataron con 0.04 U/μl de fosfatasa alcalina durante 1 h a 37°C para evitar la aparición de bandas difusas en la electroforesis. Se añadió tampón de carga, se hirvieron las muestras y se realizó una electroforesis desnaturalizante no reductora en geles de poliacrilamida, transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos.

#### Determinación del estado de carbonilación proteica

Se centrifugaron cultivos de 50 ml de *S. pombe* a OD<sub>600</sub> de 0.5 a 3000 rpm durante 3 min. Se lavó el precipitado celular con H<sub>2</sub>O y se resuspendió en 0.25 ml de “carbonilation buffer” (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.05% NP-40, 1 mM PMSF, 5 mM benzamidina, 5 mg/ ml aprotinina). Se añadieron glass beads y se procedió a la disrupción mecánica de las células en un *bead beater* (3 veces durante 25 s, intensidad 4.5, 4°C; bead beater Fast Prep; Bio 101). Se obtuvo el extracto crudo separándolo del debris celular por centrifugación a 13200 rpm durante 10 min y aspiración del sobrenadante. Se cuantificó la proteína total del extracto a través del método Bradford. Se añadió 1

volumen de SDS 12% hasta una concentración final del 6% a 10 µg de proteína total (1 volumen) y se hirvió a 100°C durante 3 min. Se añadió 1 volumen de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM en TFA 10% y se dejó reaccionar durante 10 min a 25°C. La reacción fue interrumpida mediante la adición de 1 volumen de 2 M Tris base, 30% glicerol, 15% β-mercaptoetanol, observándose un viraje de color amarillo a naranja, debido al cambio de pH. Las muestras se resolvieron en geles de acrilamida al 10% mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hibridaron con un anticuerpo anti-DNPH (Sigma D 9656).

#### Medición del consumo de oxígeno

Primariamente, se crecieron los cultivos cada uno en el medio de interés hasta que alcanzaron la fase estacionaria. Seguidamente se diluyeron para obtener, después de un crecimiento de 15-17 horas, una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 1. En los casos indicados, dos horas antes de la medición del consumo de oxígeno, se trataron o no las células con 0.135 mg/l antimicina A (Sigma-Aldrich) o 25 mg/l 2,4-dinitrofenol (Sigma-Aldrich). Las muestras celulares se lavaron una vez, cada una en su respectivo medio, y para medir el consumo de oxígeno se diluyeron 1:10 en medio mínimo a una OD<sub>600</sub> final de 1. Para los experimentos del apartado 2 de los resultados se utilizó el oxímetro HI9146 con sonda HI7640714 (Hanna Instruments), y la lectura de los valores se hizo cada minuto durante 15 minutos. Para los experimentos del apartado 3 de los resultados se utilizó el oxímetro Hansatech Oxygraph (Hansatech), con lectura de los valores durante 15 minutos.

#### “Screening” de la librería de mutantes

Utilizamos una colección de aproximadamente 2700 mutantes por delección de cepas haploides de *S. pombe*. La colección se creció en medio rico continente kanamicina (100 mg/ml) a 30 °C durante dos días,

en placas de 96 pocillos sin agitación. Los cultivos se replicaron con un replicador metálico (Sigma-Aldrich) sobre 4 placas sólidas continentes diferentes medios: medio rico con o sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), medio mínimo, o medio mínimo con glicerol (1% glicerol, 0.1% glucosa). Las placas se incubaron a 30 °C durante 3-4 días.

#### Determinación de la concentración de glucosa en el medio

Se obtuvo el sobrenadante de los cultivos de interés centrifugando 1 ml de cultivo a máxima velocidad. Seguidamente se obtuvo una dilución 1:10 en agua MilliQ y esta se usó para la medición de la concentración de glucosa con un kit comercial de espectrofotometría (Cromatest-Linear).

#### Determinación de los niveles intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El nivel de peróxido intracelular se analizó utilizando el marcador fluorescente 2',5'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA; Molecular probes). Este marcador produce fluorescencia verde en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en células vivas como muertas. Para distinguir entre las dos poblaciones se utilizó el yoduro de propidio (IP) como indicador de las células muertas (Sigma-Aldrich). Se crecieron las células en medio rico hasta una OD<sub>600</sub> de 0.3. En algunos casos, se añadió 0.135 mg/l antimicina A o 25 mg/l 2,4-dinitrofenol dos horas antes de recoger las células. Se lavaron las células tres veces con PBS (137 mM NaCl, 10 mM phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4) y se incubaron con 50 mM DCFH-DA and 3 µg/ml IP durante 40 min en hielo y en condición de oscuridad. El nivel de peróxido y la viabilidad de las células se analizaron simultáneamente por citometría de flujo. El IP se leyó con el canal FL3 (que detecta fluorescencia roja) mientras que el DCFH-DA se leyó en el canal FL1 (que detecta fluorescencia verde). Se analizó la cantidad de fluorescencia de DCFH-DA sólo en las células negativas al IP. Se analizaron un total de 10000 células (negativas para IP) por cada cepa. Por cada cultivo celular, se normalizó la fluorescencia absoluta respecto

al tamaño celular. Los valores de fluorescencia relativa se calcularon utilizando la cepa salvaje como referencia (valor de 1).

#### Crecimiento en condiciones de anaerobiosis

La condición de anaerobiosis se consiguió a través del uso de placas Anaerocult (Merck), prehumedecidas con 30 ml de H<sub>2</sub>O milli-Q en contacto con las placas y aisladas del ambiente a través de un contenedor cerrado.

#### Ensayo de sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o MG

Se crecieron los cultivos en medio líquido, mínimo o rico según el experimento, hasta una OD<sub>600</sub> de 0.5. Se diluyeron las células en H<sub>2</sub>O y se depositó una gota de 5 µl (en el caso de gotas hechas manualmente) o 3 µl (cuando se utilizó el replicador metálico) continente el número de células indicado en una placa de medio mínimo sólido en presencia o no de MG o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las concentraciones indicadas. Se crecieron las placas durante 3-4 días a 30 °C.

#### Condición de fase estacionaria y ensayo de supervivencia

Se crecieron las células en los medios indicados (MM, YE, YE 1% glucosa y YE 4% glucosa) hasta que alcanzaron la fase estacionaria a una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 5-8, dependiendo de la cepa y del medio. Cuando indicado, 2,4-dinitrofenol (Sigma), DL-α-tocoferol acetato (Sigma), antimicina A (Sigma) o el análogo del ATP 1NM-PP1 (Calbiochem) se añadieron a las concentraciones y OD<sub>600</sub> especificadas en cada experimento. Tanto de los cultivos en fase exponencial como de cultivos con diferentes días de fase estacionaria, se diluyeron las células en H<sub>2</sub>O y se depositó una gota de 3 µl (se utilizó el replicador metálico) continente el número de células indicado en una placa de medio rico sólido. Se crecieron las placas durante 3-4 días a 30 °C.

Cuando indicado, cultivos de la cepa salvaje 972, tratada o no con NM-PP1, y de la cepa  $\Delta sty1$  AV18 se trataron durante 2 horas con un estrés por calor de 48 °C antes de emplacar las gotas.

Para los ensayos de viabilidad utilizando marcadores fluorescentes como indicadores de la actividad metabólica, alícuotas de los mismos cultivos utilizados para los experimentos de viabilidad en placa se tiñeron con yoduro de propidio (IP) o floxina B. Para la tinción con yoduro de propidio, se centrifugaron las células, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 3 µg/ml IP durante 40 min en hielo y en condición de oscuridad. Para la tinción con floxina B, se incubaron las células con 5 µg/ml del marcador durante 2 horas con agitación, en condición de oscuridad y a 30 °C. Después de la incubación se lavaron las células dos veces con PBS. De cada muestra se analizaron, por citometría de flujo, un total de 10000 células. Se utilizó el canal FL3 para el IP y FL2 para la floxina B.



## **DISCUSIÓN**



Los organismos aeróbicos han aprendido a convivir con la formación inevitable de cantidades fisiológicas de especies reactivas de oxígeno (ROS), de forma que éstas puedan participar en procesos de señalización pero sin llegar a alcanzar concentraciones tóxicas. De hecho, numerosos trabajos han especulado acerca de la capacidad que tienen las ROS para inducir dichas respuestas celulares anti-estrés, y de su capacidad en extender la esperanza de vida (Kharade et al., 2005; Schulz et al., 2007). Sin embargo, también hace décadas que se postula que el estrés oxidativo es la causa principal de daño molecular asociado al envejecimiento (para una revisión, ver (Muller et al., 2007)). Por lo tanto, la formación de ROS y su acumulación han estado contradictoriamente relacionados tanto con daño molecular sistémico y consecuente reducción de la esperanza de vida, como con la promoción de la supervivencia y extensión de la vida.

Nosotros trabajamos con la levadura *Schizosaccharomyces pombe* para intentar entender procesos de señalización mediados por ROS. Así, cuando se añade peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al medio de cultivo, se inducen en la levadura de fisión dos rutas de transmisión de señal que responden a dosis moderadas (ruta del factor de transcripción Pap1) o elevadas (tóxicas) (ruta de la MAP quinasa Sty1) de peróxidos. Cuando estas rutas se activan, por mecanismos moleculares todavía no muy bien caracterizados, el perfil de expresión génica celular cambia dramáticamente, con el objetivo final de prevenir daños futuros o reparar los que ya han ocurrido.

En relación a la activación de las rutas de Sty1 y de Pap1 en respuesta a estrés exógeno, estudié al principio de mi tesis doctoral el papel de un metabolito secundario de la fosforilación oxidativa, el metilglioxal, que al ser generado de forma endógena podría modular estas rutas de respuesta a estrés en función de la fase del crecimiento (apartado 1 de esta discusión).

Sin embargo, la intención prioritaria de mi proyecto de tesis ha sido utilizar *S. pombe* para estudiar lo que llamamos estrés oxidativo intrínseco, y averiguar así: (i) qué fluctuaciones existen entre síntesis y

degradación de ROS en función de la fase de crecimiento o del medio de cultivo (apartado 2 de discusión); (ii) que actividades celulares son esenciales para evitar estrés oxidativo endógeno, realizando una selección de una colección de mutantes (apartado 3 de discusión); (iii) qué factores medioambientales y genéticos regulan el envejecimiento cronológico en *S. pombe* (apartado 4 de discusión). Finalmente, basándonos en la literatura y en los resultados de este trabajo, trazamos un balance de los efectos positivos y negativos del estrés oxidativo y confirmamos que éstos dependen de la gravedad del estrés y de las dosis de ROS que se llegan a producir (apartado 5 de esta discusión).

## **1 El metabolito metilglioxal activa las rutas de respuesta a estrés de Pap1 y de Sty1, pero no es el encargado de activar a Sty1 en la transición a fase estacionaria**

El metilglioxal (MG) es un metabolito secundario producido por la célula de forma fisiológica y que, dependiendo de las concentraciones, puede llegar a ser un producto tóxico. Estábamos interesados en el estudio de la transición de un crecimiento exponencial a la fase estacionaria y de la activación de Sty1 en esa transición, y nos llamó la atención un trabajo publicado en el que se reportaba que la concentración del oxoaldehído MG aumentaba a lo largo de la curva de crecimiento en *S. cerevisiae*, con un pico máximo en la fase estacionaria (Maeta et al., 2004). La acumulación de este metabolito podría inducir alguno de los cambios de expresión génica que promueven esa transición en *S. pombe*. Además, algunos estudios han demostrado que alguno de los efectos tóxicos de MG pueden estar mediados por su papel en la inducción de estrés oxidativo, así que decidimos averiguar si MG es capaz de activar alguna de las rutas que responden a estrés oxidativo en *S. pombe*, y si este metabolito podría tener algún papel en la activación de Sty1 en la transición a fase estacionaria.

En primer lugar, confirmamos que, como en muchos otros organismos, el MG es tóxico en *S. pombe*, como indicaron los experimentos de viabilidad en placa (Fig. 6). La levadura *S. pombe*

parece ser más sensible que *S. cerevisiae* a la toxicidad del oxoaldehído porque pierde viabilidad a una menor concentración en placa (Maeta et al., 2004).

Las rutas que se activan frente a estrés por MG y que son importantes para la viabilidad frente a este tipo de estrés son la ruta de Pap1 y la ruta de Sty1. Como ocurre con la respuesta frente a peróxido, también para MG la ruta de Pap1 se activa a concentraciones más bajas que las que se necesitan para activar a Sty1 (1 mM y 4 mM, respectivamente). Aunque sea menos sensible a bajas concentraciones, la ruta de Sty1 parece ser, de las dos, la más importante para responder a este tipo de estrés. Puede que la ruta de la quinasa sirva para responder a dosis altas que sí son letales para las células, mientras que las dosis bajas de MG que activan a Pap1 no sean perjudiciales para la viabilidad.

Otro proceso donde parece tener un papel la MAP quinasa pero no el factor de transcripción Pap1 es la regulación de la transcripción de *glo2*, el gen que codifica para uno de los dos enzimas del sistema glioxalasa. Si las dosis que activan a Pap1 no son letales, puede que no alcancen una concentración suficiente para activar al sistema glioxalasa. Además, puede que la ruta de Pap1, frente a tratamiento con MG, active una ruta de detoxificación distinta, como la de la aldosa reductasa *GRE3* descrita en *S. cerevisiae* (Aguilera and Prieto, 2001).

Resulta difícil establecer la importancia de la glioxalasa Glo1 en la detoxificación de MG. La regulación de la transcripción de *glo1* frente a estreses es dudosa: estudios de microarrays muestran que se expresa frente a estrés osmótico de forma Sty1-dependiente (Chen et al., 2003), pero otros autores publicaron que, frente a este tipo de estrés, no hay aumento de la expresión de *glo1* y la actividad del enzima no depende de Sty1 (Takatsume et al., 2005).

Por otra parte, se describió para *S. cerevisiae* un aumento de la concentración de MG intracelular y una consecuente activación de *YAP1* en una cepa  $\Delta$ *glo1*. Dado que Yap1 es homólogo a Pap1 y que *S. pombe* parece ser sensible a concentraciones más bajas de MG, esperábamos

observar un aumento de la concentración intracelular de MG y la activación de Pap1 en una cepa  $\Delta g1o1$ . El hecho de que esto no ocurra nos indica que la actividad detoxificante del sistema glioxilasa podría ser suplida por otro mecanismo o que la sola delección de *g1o1* no incremente la concentración de MG intracelular hasta el punto de ser detectable experimentalmente y de ser capaz de activar a las rutas de respuesta.

Respecto a la ruta de Pap1, el estrés por MG extracelular provoca una activación con características intermedias a la activación por  $H_2O_2$  y por dietilmaleato porque se trata de una activación reversible, como la provocada por  $H_2O_2$ , pero que no varía el estado redox de la proteína y no provoca la consecuente formación de un puente disulfuro, como en el caso de tratamiento con dietilmaleato (Fig. 12 C).

Finalmente, observamos activación de la ruta de Sty1, pero no de la ruta de Pap1, durante la entrada a la fase estacionaria, y concluimos que la activación de la MAP quinasa no es debida a un incremento de MG intracelular en esta fase del crecimiento.

## **2 Los medios de cultivo determinan los niveles basales intracelulares de ROS en *S. pombe* en base a su capacidad para fomentar el metabolismo oxidativo**

La levadura *S. pombe* fue caracterizada en un primer momento como “petite negative” pero se demostró que, contrariamente a otras levaduras pertenecientes a este grupo, es capaz de vivir en condiciones anaeróbicas y sufre el efecto Crabtree, que ocurre cuando elevadas concentraciones de glucosa reprimen la respiración en condiciones aeróbicas (Heslot et al., 1970). La capacidad de respirar la glucosa al entrar en fase estacionaria y el incremento de los niveles de enzimas para la respiración en esta condición fueron los aspectos que llevaron a afirmar que *S. pombe* se comporta de forma muy similar a *S. cerevisiae* respecto a su forma de utilizar glucosa. Nuestro trabajo demuestra que la levadura de fisión y la de gemación son más distintas de lo que se creía porque *S. pombe*, en fase exponencial, no solamente fermenta glucosa sino que, además, la respira. El efecto Crabtree, entonces, es más severo en *S. cerevisiae* que

en *S. pombe*, y el porcentaje de oxígeno respirado aumenta a medida que disminuye la cantidad de glucosa fermentable en el medio. Así, la tasa de respiración es menor en un medio rico (YE, 3% glucosa) respecto a un medio mínimo (MM, 2% glucosa), los dos medios más comúnmente usados en los estudios con *S. pombe*.

Gracias a los ensayos de carbonilación de proteínas, concluimos que el nivel de estrés oxidativo endógeno es directamente proporcional al porcentaje de respiración, debido a la producción de ROS. Así, células creciendo en MM, donde hay una tasa de respiración elevada, presentan un nivel de proteínas carboniladas mayor que en YE. Una de las consecuencias es que el nivel basal de estrés oxidativo en un cultivo creciendo en MM líquido prepara las células para un estrés añadido en líquido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 17). Al contrario, células creciendo en MM líquido y sucesivamente sembradas en MM o YE sólidos conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobreviven mejor en YE, donde sólo tienen que responder a estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular, respecto a MM, donde se suman el estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular a la formación de ROS por respiración (Fig. 16).

En la selección para aislar mutantes incapaces de sobrevivir a estrés oxidativo endógeno, consideramos la posibilidad de utilizar glicerol, y no glucosa, como fuente de carbono para que las células tuvieran la mayor tasa de respiración y produjeran más ROS. Preferimos elegir el MM con glucosa en lugar de MM con glicerol porque en este último las células tienen problemas para crecer y necesitan un porcentaje mínimo de glucosa (0.1-0.2%) para arrancar el crecimiento.

En conclusión, con este trabajo, hemos establecido que los dos medios de cultivo más frecuentemente utilizados con la levadura de fisión, MM y YE, promueven distintos grados de respiración y fermentación. Así, MM (con menor contenido de glucosa) induce un metabolismo con un mayor componente de respiración que el YE. Esto nos ha permitido manipular los niveles de estrés oxidativo intrínseco, ya que las células que crecen en MM parecen inducir una producción mayor de ROS.

### **3 ¿Qué actividades celulares regulan los niveles endógenos de ROS? Selección de una colección de mutantes por delección de *S. pombe***

Gracias al trabajo realizado en los últimos años por miembros de nuestro laboratorio, sabemos que podemos aumentar los niveles intracelulares de ROS por medio de la eliminación ya sea del gen que codifica para la peroxiredoxina Tpx1 (principal detoxificador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o del que codifica para la superóxido dismutasa citosólica, Sod1.

Por otro lado, teníamos interés en averiguar si podíamos exacerbar los niveles endógenos de ROS por procedimientos distintos a eliminar actividades detoxificadoras de los mismos.

#### **3.1 Procedimiento de la doble selección para aislar mutantes con estrés oxidativo basal**

La selección que realizamos tenía el objetivo de identificar nuevos mutantes por delección en *S. pombe* que fueran sensibles a estrés oxidativo, tanto intrínseco como extrínseco. La mayor fuente de producción intracelular de ROS es la cadena de transporte de electrones, activa durante la respiración. Por esta razón el primer paso de nuestra selección fue aislar mutantes incapaces de crecer en MM, donde las células tienen más facilidad para respirar. Con esta primera selección pudimos identificar mutantes sensibles a ROS (fueran mutantes incapaces de detoxificar especies reactivas del oxígeno como mutantes que tenían una elevada producción de ROS), pero también mutantes con auxotrofías para algún aminoácido. Hipotetizando que células sensibles a estrés oxidativo endógeno deberían ser también sensibles a peróxido extracelular, hicimos una segunda selección en YE con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para descartar aquellos mutantes que eran sensibles a MM solamente por razones de auxotrofia. Nuestro interés se focalizó en los mutantes sensibles a ambas condiciones.

El resultado de la doble selección nos permitió identificar un total de 51 mutantes. Entre ellos figuran 19 cepas (Tabla. 1) con mutaciones en

genes que codifican para distintas proteínas mitocondriales, para proteínas detoxificadoras de ROS (Gcs1, implicada en la síntesis de glutation), para proteínas relacionadas con la homeostasis de hierro y cobre (parece que los mutantes seleccionados en esta selección, *Δcuf1* y *Δfep1*, presentan niveles muy altos de hierro intracelular que podrían explicar los niveles elevados de estrés oxidativo endógeno, al favorecer la formación de radical hidroxilo por la reacción de Fenton; Natalia Gabrielli y Elena Hidalgo, comunicación personal), y para proteínas reguladoras de transcripción y/o traducción cuya relación con estrés oxidativo todavía no ha sido establecida.

### 3.2 Defectos en el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial provocan un incremento del estrés oxidativo endógeno

Nos sorprendió el hecho de que la mayoría de mutantes mitocondriales seleccionados codificaran para componentes de la cadena de transporte de electrones. Con nuestra selección global, determinamos que cualquier defecto en la composición de la cadena conduce a un aumento del nivel basal de ROS. Esto nos pareció en principio sorprendente, porque imaginamos que un defecto de la cadena podría traducirse en una eliminación del metabolismo oxidativo, que sería sustituido por un mayor metabolismo fermentativo y una consecuente disminución de la producción de ROS. Sin embargo, el resultado fue esencialmente opuesto al que esperábamos: aunque confirmamos que en todos los casos analizados el consumo de oxígeno al final de la cadena de transporte de electrones era nulo (Fig. 21 A), la concentración intracelular de ROS en estos mutantes era superior al de la cepa salvaje, incluso cuando crecían en YE (Fig. 21 B). Es importante resaltar que todos los mutantes de nuestra colección con defectos en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, sin excepción, aparecieron como positivos en esta doble selección realizada, mientras que mutantes en componentes de la ATPasa, que no podrían generar ATP por metabolismo oxidativo pero que no alterarían el paso de electrones por la cadena, no

aparecieron en los listados. Nuestra conclusión es que mutaciones que impiden un buen funcionamiento de un complejo de la cadena, así como inhibidores del mismo (tipo antimicina A; Fig. 21 B), provocan una acumulación de los complejos anteriores en sus formas reducidas y su consecuente auto-oxidación, además de un incremento del escape de electrones y formación concomitante de ROS.

Las cepas que resultaron más afectadas por el tratamiento en placa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron las cepas *Δdps1* y *Δcoq4*, ambas necesarias para la producción de ubiquinona. Además, la *Δcoq4* es una de las cepas que menos responde a tratamiento con antioxidantes o a condiciones anaeróbicas (Fig. 20). Está demostrado que la ubiquinona, además de formar parte del sistema de transporte de electrones, actúa como antioxidante (Saiki et al., 2003; Suzuki et al., 1997), así que no podemos descartar que el fenotipo tan grave de las cepas *Δdps1* y *Δcoq4* sea en parte debido a la incapacidad de detoxificar ROS, además de un elevado estrés oxidativo endógeno debido al mal funcionamiento de la mitocondria.

Numerosos estudios describen que la mitocondria tiene un papel importante en las enfermedades genéticas neurodegenerativas y en el envejecimiento, pero, hay controversia a la hora de establecer si la causa principal que provoca las enfermedades es la disminución de la fosforilación oxidativa o el incremento del estrés oxidativo (Swerdlow, 2007). Nuestros resultados proporcionan una visión general en la que una deficiencia en el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones provoca un estrés oxidativo basal y una menor esperanza de vida. En la selección global de genes requeridos para el crecimiento en MM (ver apartado anterior) hemos establecido que mutaciones en 19 genes distintos que codifican para proteínas mitocondriales inducen una salida acentuada de electrones en la cadena de transporte y una concomitante producción masiva de ROS. Mutaciones en otros 30 genes no mitocondriales generan un fenotipo de crecimiento defectuoso en MM, y su caracterización está pendiente.

## 4 Estudios de envejecimiento cronológico en *S. pombe*

Durante la elaboración de mi tesis doctoral, hemos puesto a punto diferentes ensayos para estudiar el estado de salud de cultivos celulares de *S. pombe* en fase estacionaria, de forma que podemos comenzar ahora a estudiar lo que se ha llamado envejecimiento cronológico. El estrés oxidativo se ha descrito como una de las principales causas del envejecimiento cronológico en diferentes organismos modelo. *S. cerevisiae* es uno de los organismos más caracterizados tanto a nivel de envejecimiento replicativo como cronológico, mientras que poco se ha descrito en *S. pombe*.

Determinamos, entonces, tanto la viabilidad de cultivos de *S. pombe* como el estado de daño oxidativo de las células supervivientes. Como resumen, en los últimos años hemos determinado que la ruta de la MAP quinasa Sty1 participa en la inducción de programas que alargan la esperanza de vida de cultivos de *S. pombe*, y hemos analizado el efecto tanto de varios medios de crecimiento como de distintas rutas celulares en el envejecimiento.

### 4.1 Efectos medioambientales que modulan el envejecimiento cronológico en la levadura de fisión

La falta de nutrientes es para la célula una condición de estrés y como tal existen rutas de respuesta que se activan para responder a esta situación y evitar la muerte celular. En el caso de las levaduras la forma más común de responder a la falta de nutrientes, si no pueden esporular, es entrar en fase estacionaria, un estadio del crecimiento caracterizado por la falta de división celular, variaciones en la expresión génica y del fenotipo y adquisición de resistencia a estrés. La capacidad de sobrevivir en esta condición durante un tiempo más o menos largo es lo que se define como envejecimiento cronológico.

En numerosos organismos está descrito que la dieta, o restricción calórica, influye positivamente sobre el envejecimiento, permitiendo un aumento de la esperanza de vida. En condición de restricción calórica, la

cantidad de nutrientes es necesaria y suficiente para suplir a las funciones fisiológicas de la célula, sin llegar a ser una condición de desnutrición. En levadura, la manera de reproducir una dieta, o restricción calórica, es disminuir la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. En nuestros ensayos utilizamos dos modelos distintos de restricción calórica. La primera opción fue comparar el fenotipo en fase estacionaria de una cepa creciendo en YE, con 3% de glucosa (además de las fuentes de carbono derivadas del extracto de levadura contenido en el medio), o en MM, con glucosa al 2% como única fuente de carbono. La ventaja de este modelo es que la densidad final de los cultivos es parecida entre los dos medios y las curvas de crecimiento resultan ser más comparables. La segunda opción fue utilizar YE, donde mantuvimos constante la concentración de extracto de levadura, que tuviera diferentes concentraciones de glucosa. En este caso obtenemos una diversidad más acentuada entre densidades finales de los cultivos, pero la ventaja es que la única diferencia es el porcentaje de azúcar: esto hace que la comparación entre los dos medios sea más sencilla de interpretar. Esta segunda opción es la más utilizada en los estudios de envejecimiento y restricción calórica en levadura (Dilova et al., 2007; Roux et al., 2009). En ambos casos pudimos observar que las células salvajes crecidas en el medio con menor cantidad de nutrientes son las que tienen un mejor envejecimiento cronológico, es decir, muestran una viabilidad más duradera en el tiempo y mayor resistencia a estrés.

#### 4.2 La MAP quinasa Sty1 es esencial para promover la viabilidad de cultivos sometidos a restricción calórica

En cultivos que sufren restricción calórica, determinamos que tiene lugar una activación de la respuesta a estrés Sty1-dependiente en la transición a la fase estacionaria (Fig. 26). Además, concluimos que el aumento de viabilidad y de resistencia a estrés en fase estacionaria, provocado por la restricción calórica, ocurre de forma Sty1-dependiente: células delecionadas en el gen de la MAP quinasa no presentan una

viabilidad alargada (Fig. 24) ni ganan resistencia a estrés oxidativo o por calor (Fig. 28).

El mayor efector de la ruta de Sty1, el factor de transcripción Atf1, es importante tanto para la viabilidad como para la resistencia a estrés en fase estacionaria, pero con algunas diferencias respecto a una cepa  $\Delta sty1$ : la resistencia a estrés depende de Atf1 solo en el caso de estrés por calor pero no de estrés por  $H_2O_2$ , mientras que, respecto a la falta de viabilidad, en una cepa  $\Delta atf1$  obtenemos un fenotipo de mortalidad menos acentuado respecto a la cepa  $\Delta sty1$  (Fig. 24). Hay dos teorías que pueden explicar estas diferencias. Una posibilidad es que haya rutas Sty1-dependientes pero no Atf1-dependientes que sirven para sobrevivir en fase estacionaria, y que la respuesta Atf1-dependiente suple el fenotipo de mortalidad y de resistencia a estrés solamente de forma parcial. Si toda la ruta fuera Sty1- y Atf1-dependiente, tendríamos el mismo fenotipo tanto en la cepa  $\Delta sty1$  como en la cepa  $\Delta atf1$ .

Otra posibilidad a la viabilidad más sostenida de la cepa  $\Delta atf1$  en relación a la  $\Delta sty1$  es que la cepa  $\Delta sty1$  alcance la fase estacionaria de crecimiento en un estado fisiológico deteriorado con respecto a una cepa salvaje, que contribuiría negativamente al establecimiento de la viabilidad en este estado hipometabólico. De hecho, las células  $\Delta sty1$  presentan un fenotipo distinto a las células salvajes, incluso en ausencia de estrés. En este sentido una cepa  $\Delta sty1$  se comportaría de forma parecida a los mutantes mitocondriales: las células crecerían en fase logarítmica con un estrés oxidativo basal que induciría daños irreversibles que se harían evidentes con la fase estacionaria.

La viabilidad en fase estacionaria, parecida a la de una cepa  $\Delta atf1$ , de un mutante Sty1.AS (sensible al análogo del ATP) apoyaría esta última hipótesis (Fig. 29). En este mutante, tratado con el análogo del ATP justo antes de la transición a fase estacionaria, estaríamos bloqueando la activación de Sty1 exclusivamente durante esta transición, evitando que las células acumulen daños, debidos a la falta de la quinasa, durante la fase exponencial.

#### 4.3 Defectos en la ruta de la quinasa Pka1 inducen viabilidad incluso con exceso de glucosa en forma Sty1-dependiente

Tanto en la levadura *S. cerevisiae* como en *S. pombe* el envejecimiento cronológico es regulado por genes de las rutas de señalización de nutrientes TOR y PKA (Dilova et al., 2007; Roux et al., 2006). El aumento de la resistencia a estrés y del envejecimiento cronológico dependiente de la disponibilidad de nutrientes es regulado en el caso de *S. cerevisiae* por las rutas Ras2/cAMP/PKA/Rim15/Msn2/4 y Tor/Sch9/Rim15/Gis1 (Wei et al., 2008), mientras que en *S. pombe* un papel homólogo se ha descrito para los genes de la ruta de Pka1, *pka1* y *git3*, y para el gen *sck2*, homólogo a *SCH9* de *S. cerevisiae* (Roux et al., 2009; Roux et al., 2006).

Nuestros objetivos eran averiguar cual era la relación entre la las rutas Pka1 y TOR y la MAP quinasa Sty1 en el proceso del envejecimiento cronológico y como estas vías actúan frente a la falta de nutrientes.

En primer lugar, confirmamos que la delección de los genes *pka1* y *sck2* permite rescatar el fenotipo de corta viabilidad en fase estacionaria de una cepa salvaje creciendo en YE (Fig. 30 A), mientras que no observamos diferencias entre una cepa salvaje,  $\Delta pka1$  o  $\Delta sck2$  en la duración de la viabilidad en un medio con baja concentración de glucosa (Isabel Morales, Alice Zuin y Elena Hidalgo, resultados no publicados). En todas las condiciones testadas, la ganancia de viabilidad resulta ser Sty1-dependiente, lo que confirma que la activación de la quinasa es un evento imprescindible para sobrevivir en fase estacionaria, y que sus efectos son dominantes sobre la regulación ejercida por las rutas Pka1 o TOR.

Tanto los efectos de las rutas Pka1 y TOR sobre el envejecimiento cronológico como la capacidad de consumir oxígeno se regulan por la cantidad de nutrientes en el medio. Decidimos entonces averiguar si había una relación entre las rutas de señalización de nutrientes, la actividad respiratoria y la activación de la ruta de Sty1 en respuesta a la condición de fase estacionaria.

Determinamos que el incremento del consumo de oxígeno no solamente se observa en cepas que crecen en escasez de glucosa, sino que también en la cepa defectiva para la ruta de Pka1 creciendo en YE (Fig. 30 C): en ausencia de Pka1, las células sensan continuamente una ausencia de glucosa, incluso con exceso de la fuente de carbono. Tanto en el caso del crecimiento de una cepa salvaje en MM como en el caso de la cepa  $\Delta pka1$  creciendo en YE, se observa un incremento en la fosforilación basal de la quinasa Sty1, que relacionamos con el incremento de la respiración. La fosforilación de Sty1 es más abundante cuanto más elevada sea la actividad respiratoria (Fig. 30 D). La producción de ROS durante el proceso de respiración, entonces, podría ser la causa de la activación de Sty1, y la consecuente activación de las rutas de respuesta a estrés prepararía a las células para entrar en fase estacionaria, confiriendo una esperanza de vida más larga. Observamos que el uso de antioxidantes (Tocopherol 0.1 o 0.4 mM), que disminuyen la concentración de ROS intracelular, evita la fosforilación de Sty1 en fase estacionaria y reduce la esperanza de vida (Fig. 32), lo cual confirma nuestra hipótesis.

La ganancia de viabilidad en fase estacionaria debida a la activación de Sty1 se pudo confirmar también gracias al uso de los mutantes *wis1DD* y  $\Delta pyp1$  (Fig. 31). La activación constitutiva de Sty1, característica de estos mutantes, confiere una extensión de la esperanza de vida en medio con alta concentración de glucosa, tal y como observamos en el caso de la cepa  $\Delta pka1$ , que se caracteriza también por una elevada fosforilación basal de Sty1.

#### 4.4 ¿Cuál es el mecanismo por el que la inactivación de la ruta de TOR/Sck2 induce longevidad en *S. pombe*?

Respecto al mutante  $\Delta sck2$ , hemos observado que la delección confiere un envejecimiento cronológico más duradero pero, en este caso, esta ganancia no parece depender de la respiración, al menos en fase logarítmica. Experimentos preliminares muestran que en la cepa  $\Delta sck2$ ,

Sty1 no está fosforilado en fase exponencial, como en el caso de la *Δpka1*, pero parece fosforilarse en la transición a fase estacionaria, incluso en YE (datos no mostrados).

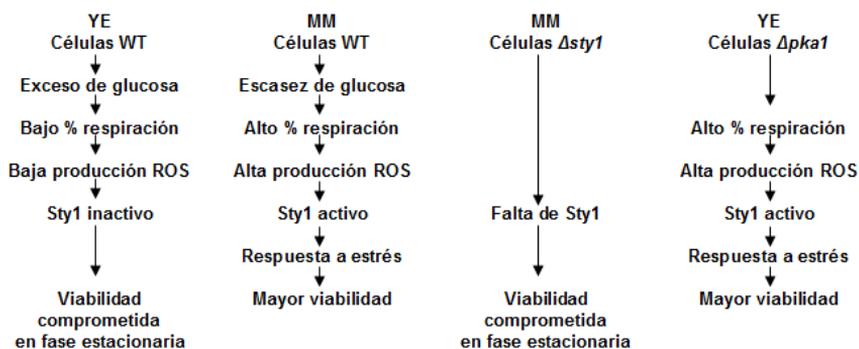
Se ha descrito para *S. cerevisiae* que no todo el efecto beneficioso de la delección de *SCH9* sobre el envejecimiento cronológico depende de un aumento de la respiración (Lavoie and Whiteway, 2008). Puede que también para *S. pombe* el efecto sobre la longevidad no ocurra de forma dependiente de la respiración, y que la activación de Sty1 y de la respuesta CESR en la curva de crecimiento de la cepa *Δsck2* no sea constitutiva, como en la *Δpka1*, sino que ocurra en un momento más puntual, como en la transición a fase estacionaria.

#### 4.5 Modelo final del papel del metabolismo oxidativo, el estrés oxidativo, las rutas de nutrientes, y las rutas de estrés sobre el envejecimiento

Los mecanismos biológicos que permiten que la dieta alargue la esperanza de vida son aún tema de discusión. Actualmente, está tomando fuerza la teoría según la cual crecer en escasez de nutrientes provoca un incremento de la respiración, con el consecuente incremento de la concentración de ROS a niveles beneficiosos para la célula. Estas ROS permitirían pre-adaptar a las células a la condición de envejecimiento gracias a la activación de la respuesta a estrés. Esta ganancia en la duración de la vida se ha descrito en organismos como *S. cerevisiae* (Barros et al., 2004; Bonawitz et al., 2007) y *C. elegans* (Schulz et al., 2007), y la ganancia de una mayor resistencia a estrés oxidativo agudo tras un pre-tratamiento se ha descrito también en células humanas (Kim et al., 2001; Lee and Um, 1999).

Aquí proponemos el modelo final de este trabajo. Según nuestros resultados, una cepa salvaje creciendo con exceso de glucosa consume nutrientes fermentando y produciendo pocas ROS. La baja concentración de estos últimos no es suficiente para activar a la quinasa Sty1 y esto provoca una viabilidad reducida en fase estacionaria debido a la falta de activación de la respuesta CESR. Por lo contrario, una cepa salvaje

creciendo en MM tiene una tasa de respiración y de producción de ROS más elevada. La alta concentración de estas últimas activa la quinasa Sty1 y, en consecuencia, la respuesta CESR, permitiendo un envejecimiento cronológico más duradero. Esta misma situación se encuentra en una cepa defectuosa para la ruta de Pka1, donde las células sensan continuamente falta de glucosa y mantienen una tasa de respiración elevada. Finalmente, en una cepa  $\Delta sty1$ , la falta de la activación de la respuesta CESR provoca que las células tengan una viabilidad muy breve en la condición de fase estacionaria (Fig. 35).



**Figura 35. Modelo final del papel del metabolismo oxidativo, el estrés oxidativo, las rutas de nutrientes, y las rutas de estrés sobre el envejecimiento en *S. pombe***

## 5 Estrés oxidativo: ¿perjudicial o beneficioso?

El estrés oxidativo afecta a la célula de forma perjudicial o beneficiosa dependiendo de muchos factores. Así, hay que tener en cuenta el tipo de célula que recibe el estrés, si salvaje o mutada, la dosis de estrés recibida, los aspectos medioambientales del entorno celular y el estadio del crecimiento de la célula en cuestión.

Un estrés oxidativo es dañino cuando la célula que lo recibe es defectuosa en los mecanismos de detoxificación o recibe una dosis demasiado elevada. Además, está ampliamente documentado que el estrés oxidativo puede provocar graves enfermedades neurodegenerativas y muerte celular (Krishnan et al., 2007; Lin and Beal, 2006). En el caso de *S. pombe*, por ejemplo, células delecionadas en los genes para la superóxido dismutasa ( $\Delta sod1$ ) o la peroxirredoxina ( $\Delta tpx1$ ) son incapaces de sobrevivir en condiciones aeróbicas, y solo pueden crecer en anaerobiosis donde la cantidad de estrés oxidativo es menor. Así mismo, los mutantes mitocondriales descritos en este trabajo de tesis son incapaces de crecer en MM, por su elevado estrés oxidativo endógeno, y sufren defectos en el envejecimiento cronológico. La falta de viabilidad ocurre cuando los mutantes crecen en MM, condición que provoca un incremento del estrés endógeno. Crecer las cepas en presencia de antioxidantes, como cisteína o N-acetil-cisteína, o en condiciones anaeróbicas permite rescatar en parte esta falta de viabilidad, pero la densidad de los cultivos no llega a ser la misma que la de una cepa salvaje. Puede haber por lo menos dos razones para explicar esta situación: (i) que la condición de anaerobiosis o los antioxidantes utilizados no sean suficientes para detoxificar por completo el estrés oxidativo intrínseco de estas cepas; (ii) que el hecho de no poder respirar afecte a los mutantes mitocondriales en el proceso de utilización de la glucosa, que solo se puede llevar a cabo por fermentación. El crecimiento en medio rico no muestra tales diferencias entre una cepa salvaje y los mutantes mitocondriales, probablemente porque en este medio cualquier cepa es más propensa a la fermentación que a la respiración, y esto

permite disminuir la producción de ROS. De todos modos, aunque la densidad máxima de los cultivos creciendo en YE sea parecida entre cepa salvaje y mutantes mitocondriales, el crecimiento de la mayoría de las cepas defectivas en la mitocondria ocurre de forma más lenta, lo que indica que el mal funcionamiento de la mitocondria afecta también al crecimiento en YE.

Respecto al envejecimiento cronológico, testado en los mutantes mitocondriales creciendo en YE, observamos que todas las cepas utilizadas tienen una viabilidad en fase estacionaria muy reducida. La explicación más razonable para este fenómeno es que el elevado nivel intrínseco de ROS debido al mal funcionamiento de la mitocondria afecta al correcto funcionamiento de la respuesta a estrés y al metabolismo celular, provocando una muerte prematura.

Obtenemos efectos beneficiosos de las ROS siempre y cuando sus niveles sean controlados y el momento en el que ocurra el estrés sea el adecuado.

Así, se han descrito diferentes situaciones en las que un estrés oxidativo permite activar un proceso de adaptación que sirve para protegerse frente a un nuevo estrés, de dosis más elevadas o de otra naturaleza.

En alguna especie bacteriana, por ejemplo, un estrés oxidativo moderado adapta las células y las protege frente a un estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más elevado o un estrés por calor (Christman et al., 1985; Crawford and Davies, 1994).

También la activación de Pap1 por dosis no tóxicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protege las células frente a un futuro estrés de dosis más altas (Quinn et al., 2002).

Un ejemplo en *S. pombe* de la importancia de las condiciones medioambientales en la respuesta a estrés es el caso citado en el apartado 2 de esta discusión: células creciendo en MM líquido, situación en la que se generan más ROS endógenas que durante el crecimiento en YE, sobreviven mejor a un estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevado gracias a la adaptación que el medio de cultivo les confiere.

Finalmente, un estrés oxidativo controlado puede ser beneficioso para el envejecimiento. En nuestro trabajo hemos observado que la presencia de un nivel controlado de ROS durante la fase exponencial del

crecimiento, debido a la respiración, parece ser la causa de la activación de Sty1 en la transición de fase exponencial a fase estacionaria. La activación de la quinasa y, en consecuencia, del CESR permitiría la adaptación a la nueva condición medioambiental de escasez de nutrientes y una extensión de la esperanza de vida media. Es importante recordar que las ROS que permiten la adaptación tienen que tener un nivel no tóxico para las células y deben producirse durante el crecimiento exponencial. Hipotetizamos que si la producción de ROS fuera tardía, ya en la fase estacionaria, la activación de la MAP quinasa Sty1, o la transcripción o traducción de las rutas de respuesta, estarían afectadas y no tendría lugar una promoción de la esperanza de vida. De hecho, según nuestros resultados, tanto la condición de fermentación, que no produce suficientes ROS y no activa a Sty1, como la ausencia de Sty1 hacen que no haya adaptación y que el envejecimiento cronológico sea más breve.

Efectos beneficioso sobre la esperanza de vida, causados por la presencia de una discreta concentración de ROS, se han descrito recientemente para el modelo humano (Ristow et al., 2009). Según este trabajo, el ejercicio, y la consecuente producción de ROS activa la transcripción de genes para la resistencia a insulina y a estrés oxidativo, promoviendo la longevidad. El uso de antioxidantes como las vitaminas C y E, complementos habituales de las bebidas energéticas diseñadas para deportistas, resultan ser inhibidores de los efectos positivos producidos por estas ROS.

## **CONCLUSIONES**



1. Sty1 se fosforila al entrar en fase estacionaria y su activación es indispensable para la supervivencia de las células en esta condición.
2. El metabolito secundario metilglioxal activa las rutas de respuesta a estrés oxidativo de Pap1 y Sty1.
3. El metilglioxal no es la causa de la activación de Sty1 en la condición de fase estacionaria.
4. En *S. pombe*, la tasa de respiración depende del medio de cultivo.
5. El consumo de oxígeno condiciona de forma proporcional los niveles intracelulares de ROS y, por lo tanto, el estrés oxidativo endógeno.
6. Mutantes defectuosos en la cadena de transporte de electrones mitocondrial presentan problemas de crecimiento y una esperanza de vida reducida, causados por su elevado estrés oxidativo endógeno.
7. La activación de Sty1 en fase estacionaria se produce sólo en condición de restricción calórica, y es consecuencia de la generación de ROS durante la respiración en estas condiciones de escasez de glucosa.
8. La activación de Sty1 en condición de restricción calórica induce la activación de genes CESR que promueven tanto la resistencia a estrés en fase estacionaria como la supervivencia de los cultivos.
9. Tal como se ha descrito en otros sistemas modelo, mutantes de *S. pombe* que inactivan las rutas nutricionales Pka1 o TOR inducen una extensión de la esperanza de vida incluso en condiciones de alto porcentaje de glucosa.
10. Los efectos beneficiosos de los mutantes de las rutas Pka1 y TOR sobre el envejecimiento cronológico dependen de la activación de la ruta Sty1.
11. Al menos en el caso del mutante  $\Delta pka1$ , la tasa de respiración está aumentada respecto a una cepa salvaje, lo que induce una activación de Sty1 incluso en condiciones de alto porcentaje de glucosa.
12. El estrés oxidativo endógeno, derivado de la respiración en condición de restricción calórica, es el factor que permite la activación de Sty1 en condición de fase estacionaria.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abordo, E. A., Minhas, H. S., and Thornalley, P. J. (1999). Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 58, 641-648.
- Aguilera, J., and Prieto, J. A. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* aldose reductase is implied in the metabolism of methylglyoxal in response to stress conditions. *Curr Genet* 39, 273-283.
- Aguilera, J., Rodriguez-Vargas, S., and Prieto, J. A. (2005). The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 56, 228-239.
- Aiba, H., Yamada, H., Ohmiya, R., and Mizuno, T. (1995). The osmo-inducible *gpd1+* gene is a target of the signaling pathway involving Wis1 MAP-kinase kinase in fission yeast. *FEBS Lett* 376, 199-201.
- Alamery, M. A., and Hoffman, C. S. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Hsp90/Git10 is required for glucose/cAMP signaling. *Genetics* 178, 1927-1936.
- Alvarez, B., and Moreno, S. (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J Cell Sci* 119, 4475-4485.
- Aoyama, K., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001). Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2347-2352.
- Asp, E., and Sunnerhagen, P. (2003). Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in *Schizosaccharomyces pombe*, interact with the MAP kinase Sty1. *Mol Genet Genomics* 268, 585-597.
- Avery, S. V. (2001). Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* 49, 111-142.
- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Nunez, A., Vicente, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* 20, 748-757.
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen

- release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 49883-49888.
- Baudouin-Cornu, P., and Labarre, J. (2006). Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* 88, 1673-1685.
- Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Touchette, A. D., Lal, S., and Szwegold, B. S. (1999). Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 198-202.
- Boch, A., Trampczynska, A., Simm, C., Taudte, N., Kramer, U., and Clemens, S. (2008). Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance. *FEMS Yeast Res* 8, 883-896.
- Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., and Shadel, G. S. (2007). Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab* 5, 265-277.
- Booth, I. R., Ferguson, G. P., Miller, S., Li, C., Gunasekera, B., and Kinghorn, S. (2003). Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochem Soc Trans* 31, 1406-1408.
- Borrelly, G. P., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Cox, S. G., Robinson, N. J., and Whitehall, S. K. (2002). Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277, 30394-30400.
- Bozonet, S. M., Findlay, V. J., Day, A. M., Cameron, J., Veal, E. A., and Morgan, B. A. (2005). Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 280, 23319-23327.
- Brownlee, M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46, 223-234.

- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B. A., and Millar, J. B. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Biol Cell* *12*, 407-419.
- Bulder, C. J. (1964a). Induction of Petite Mutation and Inhibition of Synthesis of Respiratory Enzymes in Various Yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* *30*, 1-9.
- Bulder, C. J. (1964b). Lethality of the Petite Mutation in Petite Negative Yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* *30*, 442-454.
- Castillo, E. A., Ayte, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J., Jones, N., and Hidalgo, E. (2002). Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* *45*, 243-254.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* *410*, 37-40.
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* *14*, 214-229.
- Chen, D., Wilkinson, C. R., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., and Bahler, J. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol Biol Cell* *19*, 308-317.
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., and Ames, B. N. (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* *41*, 753-762.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., and Zur Nieden, U. (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* *277*, 18215-18221.

- Cooper, R. A. (1984). Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 38, 49-68.
- Costello, G., Rodgers, L., and Beach, D. (1986). Fission yeast enters the stationary phase G<sub>0</sub> state from either mitotic G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>. *Curr Genet* 11, 119-125.
- Crawford, D. R., and Davies, K. J. (1994). Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect* 102 *Suppl* 10, 25-28.
- Czapski, G. (1984). Reaction of .OH. *Methods Enzymol* 105, 209-215.
- Dal Santo, P., Blanchard, B., and Hoffman, C. S. (1996). The Schizosaccharomyces pombe pyp1 protein tyrosine phosphatase negatively regulates nutrient monitoring pathways. *J Cell Sci* 109 ( Pt 7), 1919-1925.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effects and its relation to the petite mutation. *J Gen Microbiol* 44, 157-165.
- de Jong-Gubbels, P., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (1996). Metabolic fluxes in chemostat cultures of Schizosaccharomyces pombe grown on mixtures of glucose and ethanol. *Microbiology* 142 ( Pt 6), 1399-1407.
- de Kievit, T. R., and Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-4849.
- de Nadal, E., Alepuz, P. M., and Posas, F. (2002). Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* 3, 735-740.
- Dechant, R., and Peter, M. (2008). Nutrient signals driving cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 20, 678-687.
- Degols, G., and Russell, P. (1997). Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol* 17, 3356-3363.
- Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol* 16, 2870-2877.
- DeMoor, J. M., and Koropatnick, D. J. (2000). Metals and cellular signaling in mammalian cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 367-381.

- DeVoti, J., Seydoux, G., Beach, D., and McLeod, M. (1991). Interaction between ran1+ protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *Embo J* 10, 3759-3768.
- Dilova, I., Easlou, E., and Lin, S. J. (2007). Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 64, 752-767.
- Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 10, 225-242.
- Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A. A., Yokoyama, T., Miyata, T., Kurokawa, K., and Nakashima, I. (2000). Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Cell Biochem* 77, 333-344.
- Egel, R. (2000). Fission yeast on the brink of meiosis. *Bioessays* 22, 854-860.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24, 469-486.
- Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., and Longo, V. D. (2005). Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* 123, 655-667.
- Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2, 73-81.
- Fernandez, J., Soto, T., Vicente-Soler, J., Cansado, J., and Gacto, M. (1997). Heat-shock response in *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Curr Genet* 31, 112-118.
- Fingar, D. C., and Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171.
- Finkel, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* 4, 113-120.
- Flint, D. H., Smyk-Randall, E., Tuminello, J. F., Draczynska-Lusiak, B., and Brown, O. R. (1993a). The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs

- because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J Biol Chem* 268, 25547-25552.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., and Emptage, M. H. (1993b). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268, 22369-22376.
- Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T., and Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 24, 507-529.
- Fuge, E. K., Braun, E. L., and Werner-Washburne, M. (1994). Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176, 5802-5813.
- Fujita, M., and Yamamoto, M. (1998). *S. pombe* *sck2+*, a second homologue of *S. cerevisiae* SCH9 in fission yeast, encodes a putative protein kinase closely related to PKA in function. *Curr Genet* 33, 248-254.
- Fujita, Y., Mita, S., Ohtsuka, H., and Aiba, H. (2007). Identification of a fatty acyl-CoA synthetase gene, *lcf2+*, which affects viability after entry into the stationary phase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 3041-3047.
- Gallo, G. J., Prentice, H., and Kingston, R. E. (1993). Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 13, 749-761.
- Gallo, G. J., Schuetz, T. J., and Kingston, R. E. (1991). Regulation of heat shock factor in *Schizosaccharomyces pombe* more closely resembles regulation in mammals than in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 281-288.
- Gancedo, C., Llobell, A., Ribas, J. C., and Luchi, F. (1986). Isolation and characterization of mutants from *Schizosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism. *Eur J Biochem* 159, 171-174.
- Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218.

- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.
- Gasch, A. P., and Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* 2, 181-192.
- Goodrich-Blair, H., Uria-Nickelsen, M., and Kolter, R. (1996). Regulation of gene expression in stationary phase, p. 571-583. In E. C. C. Lin and A. S. Lynch (ed.), *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Chapman and Hall, New York, N.Y.
- Granot, D., and Snyder, M. (1993). Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast* 9, 465-479.
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., and Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 187-206.
- Greenall, A., Hadcroft, A. P., Malakasi, P., Jones, N., Morgan, B. A., Hoffman, C. S., and Whitehall, S. K. (2002). Role of fission yeast Tup1-like repressors and Prr1 transcription factor in response to salt stress. *Mol Biol Cell* 13, 2977-2989.
- Gregan, J., Zhang, C., Rumpf, C., Cipak, L., Li, Z., Uluocak, P., Nasmyth, K., and Shokat, K. M. (2007). Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Protoc* 2, 2996-3000.
- Grill, E., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H. (1985). Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230, 674-676.
- Guarente, L. (2008). Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 132, 171-176.

- Hao, Z., Furunobu, A., Nagata, A., and Okayama, H. (1997). A zinc finger protein required for stationary phase viability in fission yeast. *J Cell Sci* 110 ( Pt 20), 2557-2566.
- Harrison, C., Katayama, S., Dhut, S., Chen, D., Jones, N., Bahler, J., and Toda, T. (2005). SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast. *Embo J* 24, 599-610.
- Hatanaka, M., and Shimoda, C. (2001). The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 207-217.
- Heiland, S., Radovanovic, N., Hofer, M., Winderickx, J., and Lichtenberg, H. (2000). Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 182, 2153-2162.
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* 5, 602-607.
- Hernandez-Chico, C., San Millan, J. L., Kolter, R., and Moreno, F. (1986). Growth phase and ompR regulation of transcription of microcin B17 genes. *J Bacteriol* 167, 1058-1065.
- Heslot, H., Goffeau, A., and Louis, C. (1970). Respiratory metabolism of a "petite negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h. *J Bacteriol* 104, 473-481.
- Higuchi, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (2002). Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* 22, 1-11.
- Hirota, K., Miyoshi, T., Kugou, K., Hoffman, C. S., Shibata, T., and Ohta, K. (2008). Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456, 130-134.
- Hoffman, C. S. (2005a). Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 4, 495-503.

- Hoffman, C. S. (2005b). Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* 33, 257-260.
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1991). Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev* 5, 561-571.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 300-372.
- Hutchinson, F. (1985). Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32, 115-154.
- Inoue, Y., and Kimura, A. (1995). Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 37, 177-227.
- Inoue, Y., Tsujimoto, Y., and Kimura, A. (1998). Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. *J Biol Chem* 273, 2977-2983.
- Ishihama, A. (1999). Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells* 4, 135-143.
- Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P. S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ayusawa, D., and Suzuki, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394, 694-697.
- Ivey, F. D., and Hoffman, C. S. (2005). Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 Galpha of the glucose signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6108-6113.
- Jacinto, E. (2008). What controls TOR? *IUBMB Life* 60, 483-496.
- Janoo, R. T., Neely, L. A., Braun, B. R., Whitehall, S. K., and Hoffman, C. S. (2001). Transcriptional regulators of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene include two redundant Tup1p-like corepressors and the CCAAT binding factor activation complex. *Genetics* 157, 1205-1215.

- Jara, M., Vivancos, A. P., Calvo, I. A., Moldon, A., Sanso, M., and Hidalgo, E. (2007). The peroxiredoxin Tpx1 is essential as a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger during aerobic growth in fission yeast. *Mol Biol Cell* *18*, 2288-2295.
- Jia, K., Chen, D., and Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* *131*, 3897-3906.
- Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V., and Jazwinski, S. M. (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *Faseb J* *14*, 2135-2137.
- Jin, M., Fujita, M., Culley, B. M., Apolinario, E., Yamamoto, M., Maundrell, K., and Hoffman, C. S. (1995). *sck1*, a high copy number suppressor of defects in the cAMP-dependent protein kinase pathway in fission yeast, encodes a protein homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* SCH9 kinase. *Genetics* *140*, 457-467.
- Johnsson, A., Xue-Franzen, Y., Lundin, M., and Wright, A. P. (2006). Stress-specific role of fission yeast Gcn5 histone acetyltransferase in programming a subset of stress response genes. *Eukaryot Cell* *5*, 1337-1346.
- Kaeberlein, M., Burtner, C. R., and Kennedy, B. K. (2007). Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* *3*, e84.
- Kaeberlein, M., Hu, D., Kerr, E. O., Tsuchiya, M., Westman, E. A., Dang, N., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005). Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet* *1*, e69.
- Kalapos, M. P. (1999). Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* *110*, 145-175.
- Kalapos, M. P. (2008). The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact* *171*, 251-271.
- Kang, W. H., Park, Y. D., Hwang, J. S., and Park, H. M. (2007). RNA-binding protein Csx1 is phosphorylated by LAMMER kinase, Lkh1, in

- response to oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **581**, 3473-3478.
- Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y., and Yamamoto, M. (1996). *Schizosaccharomyces pombe gad7+* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells* **1**, 391-408.
- Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* **14**, 885-890.
- Kato, T., Jr., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P. A., and Okayama, H. (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett* **378**, 207-212.
- Kawai, M., Nakashima, A., Ueno, M., Ushimaru, T., Aiba, K., Doi, H., and Uritani, M. (2001). Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr Genet* **39**, 166-174.
- Keyser, K., and Imlay, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13635-13640.
- Kharade, S. V., Mittal, N., Das, S. P., Sinha, P., and Roy, N. (2005). Mrg19 depletion increases *S. cerevisiae* lifespan by augmenting ROS defence. *FEBS Lett* **579**, 6809-6813.
- Kim, D. K., Cho, E. S., Lee, B. R., and Um, H. D. (2001). NF-kappa B mediates the adaptation of human U937 cells to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **30**, 563-571.
- Krishnan, K. J., Greaves, L. C., Reeve, A. K., and Turnbull, D. M. (2007). Mitochondrial DNA mutations and aging. *Ann N Y Acad Sci* **1100**, 227-240.
- Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y., and Yamamoto, M. (2000). A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11(+)* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Biol Cell* **11**, 3205-3217.

- Labbe, S., Pelletier, B., and Mercier, A. (2007). Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biometals* 20, 523-537.
- Lavoie, H., and Whiteway, M. (2008). Increased respiration in the *sch9Delta* mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryot Cell* 7, 1127-1135.
- Lee, B. R., and Um, H. D. (1999). Hydrogen peroxide suppresses U937 cell death by two different mechanisms depending on its concentration. *Exp Cell Res* 248, 430-438.
- Lee, Y. J., Galoforo, S. S., Berns, C. M., Chen, J. C., Davis, B. H., Sim, J. E., Corry, P. M., and Spitz, D. R. (1998). Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 5294-5299.
- Lenssen, E., Oberholzer, U., Labarre, J., De Virgilio, C., and Collart, M. A. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Ccr4-not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway. *Mol Microbiol* 43, 1023-1037.
- Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lin, S. J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez, P. A., Culotta, V. C., Fink, G. R., and Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344-348.
- Liu, Y., Song, X. D., Liu, W., Zhang, T. Y., and Zuo, J. (2003). Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* 7, 49-56.
- Lo, T. W., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T., and Thornalley, P. J. (1994). Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 269, 32299-32305.

- Longo, V. D., and Fabrizio, P. (2002). Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol Life Sci* 59, 903-908.
- Lopez-Aviles, S., Grande, M., Gonzalez, M., Helgesen, A. L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J. B., and Aligue, R. (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell* 17, 49-59.
- Lyles, G. A., and Chalmers, J. (1992). The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol* 43, 1409-1414.
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., Gacto, M., and Cansado, J. (2004). A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 279, 41594-41602.
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., and Yamamoto, M. (1994). Cloning of the pka1 gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 269, 9632-9637.
- Maeta, K., Izawa, S., Okazaki, S., Kuge, S., and Inoue, Y. (2004). Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Mol Cell Biol* 24, 8753-8764.
- Martin, D. E., and Hall, M. N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17, 158-166.
- Masoro, E. J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126, 913-922.
- Mata, J., Wilbrey, A., and Bahler, J. (2007). Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* 8, R217.
- Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F., and Yamamoto, M. (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and

- activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol* 27, 3154-3164.
- Mehta, S., Velmurugan, S., and Lobo, Z. (1998). Repression of enzymes of the pentose phosphate pathway by glucose in fission yeast. *FEBS Lett* 440, 430-433.
- Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165-199.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 43, 477-503.
- Mutoh, N., and Kitajima, S. (2007). Accelerated chronological aging of a mutant fission yeast deficient in both glutathione and superoxide dismutase having cu and zn as cofactors and its enhancement by sir2 deficiency. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2841-2844.
- Neely, L. A., and Hoffman, C. S. (2000). Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Mol Cell Biol* 20, 6426-6434.
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., and Shiozaki, K. (2000). Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 11, 1169-1181.
- O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., and O'Shea, E. K. (2002). Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet* 18, 405-412.
- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (1999). A fission yeast gene (*prr1(+)*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J Biochem (Tokyo)* 125, 1061-1066.
- Ohmiya, R., Yamada, H., Kato, C., Aiba, H., and Mizuno, T. (2000). The *Prr1* response regulator is essential for transcription of *ste11+* and for sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet* 264, 441-451.
- Ohmiya, R., Yamada, H., Nakashima, K., Aiba, H., and Mizuno, T. (1995). Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes

- encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol Microbiol* 18, 963-973.
- Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., and Aiba, H. (2008). A novel gene, *ecl1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res* 8, 520-530.
- Ohtsuka, H., Ogawa, Y., Mizuno, H., Mita, S., and Aiba, H. (2009). Identification of Ecl family genes that extend chronological lifespan in fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 885-889.
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G., and Ow, D. W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J* 11, 3491-3499.
- Oshiro, T., Aiba, H., and Mizuno, T. (2003). A defect in a fatty acyl-CoA synthetase gene, *lcf1+*, results in a decrease in viability after entry into the stationary phase in fission yeast. *Mol Genet Genomics* 269, 437-442.
- Papoulis, A., al-Abed, Y., and Bucala, R. (1995). Identification of N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry* 34, 648-655.
- Perego, P., and Howell, S. B. (1997). Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol Appl Pharmacol* 147, 312-318.
- Petersen, J., and Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol* 9, 1263-1272.
- Phillips, S. A., and Thornalley, P. J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 212, 101-105.
- Piper, P. W., Harris, N. L., and MacLean, M. (2006). Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mech Ageing Dev* 127, 733-740.

- Pompliano, D. L., Peyman, A., and Knowles, J. R. (1990). Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29, 3186-3194.
- Poole, R. K., and Lloyd, D. (1973). Oscillations of enzyme activities during the cell-cycle of a glucose-repressed fission-yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h. *Biochem J* 136, 195-207.
- Powers, R. W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K., and Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* 20, 174-184.
- Preveral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J., Mounicou, S., Gruet, A., Reynaud, F., Lobinski, R., Verbavatz, J. M., Vavasseur, A., and Forestier, C. (2009). A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J Biol Chem* 284, 4936-4943.
- Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., and Toone, W. M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13, 805-816.
- Ramasamy, R., Yan, S. F., and Schmidt, A. M. (2006). Methylglyoxal comes of AGE. *Cell* 124, 258-260.
- Reverter-Branchat, G., Cabisco, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2004). Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem* 279, 31983-31989.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehnopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R., and Bluher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8665-8670.

- Robertson, L. S., Causton, H. C., Young, R. A., and Fink, G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5984-5988.
- Rodriguez-Gabriel, M. A., Burns, G., McDonald, W. H., Martin, V., Yates, J. R., 3rd, Bahler, J., and Russell, P. (2003). RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *Embo J* 22, 6256-6266.
- Rodriguez-Gabriel, M. A., and Russell, P. (2005). Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 4, 1396-1402.
- Romeo, T., and Preiss, J. (1989). Genetic regulation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*: in vitro effects of cyclic AMP and guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and analysis of in vivo transcripts. *J Bacteriol* 171, 2773-2782.
- Roux, A. E., Leroux, A., Alaamery, M. A., Hoffman, C. S., Chartrand, P., Ferbeyre, G., and Rokeach, L. A. (2009). Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS Genet* 5, e1000408.
- Roux, A. E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., and Rokeach, L. A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5, 345-357.
- Roux, P. P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344.
- Saiki, R., Nagata, A., Uchida, N., Kainou, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2003). Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure. *Eur J Biochem* 270, 4113-4121.
- Sajiki, K., Hatanaka, M., Nakamura, T., Takeda, K., Shimanuki, M., Yoshida, T., Hanyu, Y., Hayashi, T., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (2009). Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *J Cell Sci*.
- Saltsman, K. A., Prentice, H. L., and Kingston, R. E. (1999). Mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* heat shock factor that differentially

- affect responses to heat and cadmium stress. *Mol Gen Genet* 261, 161-169.
- Samejima, I., Mackie, S., and Fantes, P. A. (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *Embo J* 16, 6162-6170.
- Sanchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O., and Aligue, R. (2002). The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J Biol Chem* 277, 17722-17727.
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C., and Hidalgo, E. (2008). Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot Cell* 7, 826-835.
- Saxena, M., and Mustelin, T. (2000). Extracellular signals and sources of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* 12, 387-396.
- Schultz, J. E., and Matin, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 218, 129-140.
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., and Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6, 280-293.
- Sheikh-Hamad, D., and Gustin, M. C. (2004). MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F1102-1110.
- Shimoda, C., Hirata, A., Kishida, M., Hashida, T., and Tanaka, K. (1985). Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 200, 252-257.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739-743.

- Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2276-2288.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. (1997). Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell* 8, 409-419.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. (1998). Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 9, 1339-1349.
- Silver, S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene* 179, 9-19.
- Smith, D. A., Toone, W. M., Chen, D., Bahler, J., Jones, N., Morgan, B. A., and Quinn, J. (2002). The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *J Biol Chem* 277, 33411-33421.
- Sohal, R. S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
- Stettler, S., Warbrick, E., Prochnik, S., Mackie, S., and Fantes, P. (1996). The *wis1* signal transduction pathway is required for expression of cAMP-repressed genes in fission yeast. *J Cell Sci* 109 ( Pt 7), 1927-1935.
- Stiefel, J., Wang, L., Kelly, D. A., Janoo, R. T., Seitz, J., Whitehall, S. K., and Hoffman, C. S. (2004). Suppressors of an adenylate cyclase deletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 3, 610-619.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, 321-336.
- Su, S. S., Tanaka, Y., Samejima, I., Tanaka, K., and Yanagida, M. (1996). A nitrogen starvation-induced dormant G0 state in fission yeast: the establishment from uncommitted G1 state and its delay for return to proliferation. *J Cell Sci* 109 ( Pt 6), 1347-1357.

- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1991). *Schizosaccharomyces pombe ste11+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* 5, 1990-1999.
- Suzuki, K., Okada, K., Kamiya, Y., Zhu, X. F., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1997). Analysis of the decaprenyl diphosphate synthase (*dps*) gene in fission yeast suggests a role of ubiquinone as an antioxidant. *J Biochem (Tokyo)* 121, 496-505.
- Swerdlow, R. H. (2007). Treating neurodegeneration by modifying mitochondria: potential solutions to a "complex" problem. *Antioxid Redox Signal* 9, 1591-1603.
- Takatsume, Y., Izawa, S., and Inoue, Y. (2004). Identification of thermostable glyoxalase I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* 181, 371-377.
- Takatsume, Y., Izawa, S., and Inoue, Y. (2005). Unique regulation of glyoxalase I activity during osmotic stress response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: neither the mRNA nor the protein level of glyoxalase I increase under conditions that enhance its activity. *Arch Microbiol* 183, 224-227.
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *Embo J* 14, 6193-6208.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., and Wigler, M. (1988). SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev* 2, 517-527.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004). Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29, 351-357.

- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., and Jones, N. (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* 12, 1453-1463.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., *et al.* (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 26, 663-674.
- Uritani, M., Hidaka, H., Hotta, Y., Ueno, M., Ushimaru, T., and Toda, T. (2006). Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes Cells* 11, 1367-1379.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12, 1161-1208.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B., and Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8875-8880.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayte, J., and Hidalgo, E. (2004). Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol* 52, 1427-1435.
- Wahls, W. P., and Smith, G. R. (1994). A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev* 8, 1693-1702.
- Wang, L. Y., Shimada, K., Morishita, M., and Shiozaki, K. (2005). Response of fission yeast to toxic cations involves cooperative action of the stress-activated protein kinase Spc1/Sty1 and the Hal4 protein kinase. *Mol Cell Biol* 25, 3945-3955.
- Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1994). *S. pombe* mei2<sup>+</sup> encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and

- meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* 78, 487-498.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., and Longo, V. D. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet* 4, e13.
- Weisman, R., and Choder, M. (2001). The fission yeast TOR homolog, *tor1+*, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *J Biol Chem* 276, 7027-7032.
- Weisman, R., Choder, M., and Koltin, Y. (1997). Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation. *J Bacteriol* 179, 6325-6334.
- Weisman, R., Roitburg, I., Nahari, T., and Kupiec, M. (2005). Regulation of leucine uptake by *tor1+* in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics* 169, 539-550.
- Weisman, R., Roitburg, I., Schonbrun, M., Harari, R., and Kupiec, M. (2007). Opposite effects of *tor1* and *tor2* on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* 175, 1153-1162.
- Welton, R. M., and Hoffman, C. S. (2000). Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics* 156, 513-521.
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., and Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2289-2301.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Yamamoto, A., Imai, I., and Watanabe, Y. (1997). Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. Cold spring harbour laboratory press, 1035-1106.
- Yang, P., Du, H., Hoffman, C. S., and Marcus, S. (2003). The phospholipase B homolog Plb1 is a mediator of osmotic stress response and of nutrient-dependent repression of sexual

- differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 269, 116-125.
- Yim, H. S., Kang, S. O., Hah, Y. C., Chock, P. B., and Yim, M. B. (1995). Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *J Biol Chem* 270, 28228-28233.
- Zhang, Q., Chieu, H. K., Low, C. P., Zhang, S., Heng, C. K., and Yang, H. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J Biol Chem* 278, 47145-47155.
- Zuin, A., Vivancos, A. P., Sanso, M., Takatsume, Y., Ayte, J., Inoue, Y., and Hidalgo, E. (2005). The glycolytic metabolite methylglyoxal activates Pap1 and Sty1 stress responses in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 280, 36708-36713.