

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

ÍNDICE DE FIGURAS:.....	X
ÍNDICE DE TABLAS:.....	XII
LISTA ABREVIATURAS MÁS USADAS:.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Respuestas celulares al estrés.....	3
2. Control de la traducción en respuesta al estrés. La ruta GCN.....	5
3. Estrés ácido.....	15
A. La homeostasis del pH en levadura.....	15
B. Ácidos orgánicos como conservantes alimentarios. ...	18
.....	18
Bases químicas de los ácidos débiles.....	18
Efectos celulares en la levadura.	20
4. Estrés genotóxico.....	23
A. Rutas de control de ciclo celular en respuesta a lesiones en el DNA.	23
B. Mecanismos específicos de reparación de daño...30	
1) Señalización y reparación de roturas de doble hebra (DSB).....	30
2) Roturas de simple cadena y sitios abásicos en el DNA.	32
“Base Excision Repair” (BER).....	33
“Nucleotic Excision Repair” (NER):.....	34
“Error Free Post-Replication Repair” (PRR).....	34
3) Bases desapareadas.	35
OBJETIVOS:	37
II. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	39
1. Medios y ensayos de crecimiento celular.....	41
A. Cepas de levadura empleadas.	41
B. Medios de cultivo.	41
C. Ensayos de crecimiento en medio líquido.	50
D. Ensayos de crecimiento en medio sólido (“goteos”). .	53
.....	53
E. Ensayos clonogénicos de viabilidad.	53
F. Cultivo y manipulación de bacterias.	54

2.	Tratamientos.....	55
A.	Agentes para inducir la acidificación intracelular. .	55
B.	Agentes genotóxicos.	55
3.	Inmunodetección de proteínas.	58
A.	Extractos proteicos.	58
B.	Electroforesis.	58
C.	Transferencia a membrana.....	58
D.	Tinción de membrana con “ <i>Direct Blue 71</i> ”.	59
E.	Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	59
4.	Aislamiento de tRNA y análisis por “<i>Northern Blot</i>”.	61
A.	Aislamiento de tRNA.....	61
B.	Electroforesis y transferencia de membrana del tRNA.	62
C.	Marcaje de la sonda y detección de tRNA.....	62
5.	Transformación de bacterias y levaduras.....	64
A.	Preparación de células competentes de bacteria. .	64
B.	Purificación de plásmidos.	64
C.	Transformación en bacteria.	65
D.	Transformación en levadura.	65
6.	Ensayos enzimáticos.....	66
A.	Determinación del contenido celular de ATP.....	66
B.	Ensayo de actividad β -Galactosidasa.....	66
III.	NUEVO PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA Gcn2p DE LEVADURA EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS ÁCIDO INTRACELULAR.	69
	RESULTADOS	71
1.	Resultados previos.	71
2.	<i>LEU2</i> restaura la sensibilidad del mutante nulo <i>gcn2Δ</i> a ácido acético.	71
3.	La acidificación no implica estrés energético. .	76
4.	Caracterización de mutantes de la ruta GCN en respuesta a ácido acético.....	78
5.	Gcn2p es activado por la acidificación intracelular sin ayuno de aminoácidos.	80

6.	La acidificación intracelular induce la acumulación de tRNA descargados y los mutantes haploinsuficientes de algunas aminoacil-tRNA sintetasas son hipersensibles a ácido acético.....	82
	DISCUSIÓN	87
IV.	NUEVO PAPEL DE LA QUINASA Gcn2p DE LEVADURA EN RESPUESTA A ESTRÉS GENOTÓXICO.....	91
	RESULTADOS:	93
1.	Activación de Gcn2p en respuesta a diferentes agentes genotóxicos.....	93
2.	Caracterización genética de los diferentes mutantes <i>gcn</i> en respuesta a MMS.....	96
3.	La supervivencia a MMS es independiente de fosforilación de la ser51 en eIF2 α	106
4.	Papel de las rutas de señalización y/o reparación del daño al DNA celular en la activación de Gcn2p por MMS.	108
5.	Papel de las rutas de reparación del daño en el DNA celular en la activación de Gcn2p por MMS.	113
6.	Análisis de traducción selectiva de Gcn4p en los mutantes de las rutas de reparación del DNA.	115
7.	Análisis de la implicación de tRNA descargados en la activación de Gcn2p en respuesta a MMS.	117
8.	Caracterización de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas seleccionados en el rastreo con MMS.....	121
9.	Caracterización de respuesta a MMS en cepas que sobreexpresan las diferentes aminoacil-tRNA sintetasas.....	125
	DISCUSIÓN	134
V.	CONCLUSIONES	143
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	147