

UNIVERSITAT POLITECNICA DE VALENCIA

Escola Tècnica Superior d' Enginyers Agrònoms



Caracterización de la regulación de la protón ATPasa  
PMA1 por parte de la ruta TOR en levadura  
*Saccharomyces cerevisiae*.

TRABAJO FINAL DE CARRERA

Licenciatura en Biotecnología

Alumno: Marc Cabedo López

Director: José Miguel Mulet Salort

Codirector: Ramón Serrano Salom

Valencia, Junio 2010

Curso 2009-2010



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



**ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE  
INGENIEROS  
AGRÓNOMOS**

**Anexo 4**

Autorización del director/a,  
codirector/a o tutor/a

**Datos del trabajo de fin de carrera**

Autor: Marc Cabedo López

DNI: 53224092 E

Título: Caracterización de la regulación de la protón ATPasa PMA1 por parte de la ruta TOR en levadura *S. cerevisiae*.

Área o áreas de conocimiento a las que corresponde el trabajo: Bioquímica y Biología Molecular

Titulación: Biotecnología

**A cumplimentar por el director/a, codirector/a o tutor/a del trabajo (Que imparte docencia en la ETSIA)**

Nombre y apellidos: José Miguel Mulet Salort.

Departamento: Biotecnología (área de Bioquímica y Biología Molecular)

En calidad de:  director/a

codirector/a

tutor/a

Autorizo la presentación del trabajo de fin de carrera cuyos datos figuran en el apartado anterior y certifico que se adecua plenamente a los requisitos formales, metodológicos y de contenido exigidos a un trabajo de fin de carrera, de acuerdo con la normativa aplicable en la ETSIA.

(Firma)\* Jose Miguel Mulet Salort

Valencia, 28 de Mayo de 2010.

En el caso de codirección, han de firmar necesariamente los que sean profesores de esta Escuela; si existe tutor o tutora, tiene que ser éste quien firme esta autorización.

**DIRECCIÓN DE LA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE  
INGENIEROS  
AGRÓNOMOS

## Anexo 5

Ficha resumen del Trabajo Fin de  
Carrera

### Datos personales

Nombre y apellidos: Marc Cabedo López

### Datos del trabajo de fin de carrera

Título del TFC: Caracterización de la regulación de la protón ATPasa PMA1 por parte de la ruta TOR en levadura *S. cerevisiae*.

Lugar de realización: CPI-IBMCP

Fecha de lectura:

Titulación: Biotecnología

Especialidad:

Director/a: José Miguel Mulet Salort

Codirector/a: Ramón Serrano Salom

Tutor/a:

### Resumen

El presente trabajo pretende caracterizar la regulación de la protón ATPasa PMA1 por parte de la ruta TOR en levadura *S. cerevisiae*.

La ruta de señalización dependiente de la proteína quinasa TOR es la principal responsable del control del crecimiento celular en presencia de nutrientes. La  $H^+$ -ATPasa es la responsable de la formación del gradiente electroquímico de la membrana plasmática. Su actividad correlaciona con el crecimiento celular y se activa, principalmente, por glucosa. Dado que la protón ATPasa se activa por nutrientes y TOR es responsable de la regulación en función del estado nutricional de la célula, podemos plantear la hipótesis que a nivel molecular debe haber una interconexión entre estas dos rutas.

En el presente trabajo hemos estudiado la protón ATPasa de levadura (PMA1) a tres niveles diferentes (expresión del gen, cantidad de proteína y actividad de la proteína). Puesto que la proteína TOR puede formar parte de dos complejos diferentes (TORC1 y TORC2) y que cada uno tiene una función diferente y unas dianas de regulación diferentes, hemos utilizado mutantes con alelos termosensible para TORC1 o TORC2 así como con células tratadas con rapamicina (inhibición específica de TORC1).

Tras los análisis hemos determinado que tanto la expresión del gen como la cantidad y actividad de la protón ATPasa disminuye respecto a los controles cuando inhibimos TORC1. Cuando inhibimos el complejo TORC2 el efecto sobre la protón ATPasa es perceptible, pero muy ligero, y no podemos descartar que se trate de un efecto indirecto.

Por tanto, podemos concluir que TORC1 activa la expresión del gen PMA1 que codifica la  $H^+$ -ATPasa de membrana plasmática en *Saccharomyces cerevisiae*.

**Resum**

El present treball pretén caracteritzar la regulació de la protón ATPasa PMA1 per part de la ruta TOR en el llevat *S. cerevisiae*.

La ruta de senyalització depenent de la protein quinasa TOR és la principal responsable del control del creixement cel·lular en presència de nutrients. La H<sup>+</sup>-ATPasa es la responsable de la formació del gradient electroquímic de la membrana plasmàtica. La seva activitat correlaciona amb el creixement cel·lular i s' activa, principalment, per glucosa. Donat que la protó ATPasa s' activa per nutrients i que la proteïna TOR és responsable de la regulació en funció de l'estat de nutrients de la cèl·lula, podem establir la hipòtesis que a nivell molecular ha d'haver una interconnexió entre aquestes dues rutes.

En el present treball hem estudiat la protó ATPasa de rent (PMA1) a tres nivells diferents (expressió del gen, quantitat de proteïna i activitat de la proteïna). Donat que la proteïna TOR pot formar part de dos complexos diferents (TORC1 i TORC2) i que cada un té una funció diferent i unes dianes de regulació diferents, hem emprat mutants amb al·lels termosensibles per a TORC1 o TORC2 així com amb cèl·lules tractades amb rapamicina (inhibició específica de TORC1).

Les nostres anàlisis han permès determinar que tant l'expressió del gen com la quantitat i l'activitat de la proteïna cau respecte als controls al inhibir TORC1. Quan inhibim TORC2 l'efecte sobre la protó ATPasa es perceptible, però molt lleuger, i no podem descartar que es tracte d'un efecte indirecte.

Per tant, podem concloure que TORC1 activa l'expressió del gen PMA1, que codifica la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmàtica en *Saccharomyces cerevisiae*.

## Abstract

This work aims at characterizing the TOR dependent regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase PMA1 in the baker's yeast *S. cerevisiae*.

The signalling pathway dependent on the TOR protein kinase is the main controller of cell growth in the presence of nutrients. The H<sup>+</sup>-ATPase is the responsible of forming the plasma membrane electrochemical gradient. Its activity correlates with cell growth, and is activated, mainly, by glucose. Given that the H<sup>+</sup>-ATPase is activated by nutrients and that TOR is in charge of the regulation depending on the cell nutritional status, we can propose the hypothesis that at the molecular level there must be a cross talk between these two pathways.

In the present work we have studied the H<sup>+</sup> ATPase of yeast (PMA1) at three different levels (gene expression, amount of protein and protein activity). As TOR can be found in two different protein complexes (TORC1 y TORC2) and that each one has a different role and different targets, we have used mutants carrying thermosensitive alleles for TORC1 or TORC2 as well as cells treated with rapamycin (specific inhibition of TORC1).

Our analysis have determined that gene expression, and therefore amount and H<sup>+</sup>-ATPase activity is decreased compared to control cells upon inhibition of TORC1. Inhibition of TORC2 has a much lesser effect and we cannot discard that is due to an indirect effect.

Therefore, we can conclude that TORC1 activates the expression of the *PMA1* gene that codifies the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*.

**Key words** H<sup>+</sup> ATPase, TOR pathway, *PMA1* gene, *S. cerevisiae*.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estrés abiótico en plantas.....	1
1.2 Transporte de iones en plantas.....	5
1.3 Levadura como organismo modelo.....	8
1.4 Transporte de iones en levadura.....	9
1.5 ATPasa función y regulación.....	18
1.6 Ruta TOR .....	21
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 Cepas de levadura.....	30
3.2 Medios y condiciones de cultivo.....	30
3.3 Extracción RNA y análisis Northern.....	31
3.4 Extracción de proteínas y análisis western.....	33
3.5 Análisis de la actividad enzimática.....	36
RESULTADOS.....	37
4.1 Northern.....	37
4.2 Western.....	43
4.3 Actividad.....	52
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58

# INTRODUCCIÓN

# Introducción

## 1.1 El estrés abiótico en plantas

Las plantas son organismos sésiles, por lo que están constantemente expuestas a una serie de condiciones ambientales cambiantes. Cuando el ambiente no es propicio para la planta puede aparecer el estrés. En Biología definimos el estrés como una fuerza adversa o enfermedad, que inhibe el funcionamiento normal y el bienestar de un sistema biológico, como las plantas (Jones *et al.*, 1989). El crecimiento y la productividad de las plantas se ven negativamente afectados por condiciones climáticas o ambientales adversas, lo que denominamos estrés abiótico, para diferenciarlo del estrés biótico que es el causado por otros organismos. El estrés abiótico es la principal lacra de los cultivos de todo el mundo, causando pérdidas por valor de cientos de millones de euros cada año.

El frío, la salinidad y la sequía son considerados los estreses abióticos por excelencia debido a su gran capacidad destructora, ya que afectan a gran parte de los cultivos del mundo. Muchos son los estudios realizados para poder reducir sus consecuencias y se han logrado grandes avances pero aún y así sigue siendo un problema mundial.

La salinidad y la sequía ejercen su influencia en la célula por perturbar el equilibrio osmótico e iónico. El exceso de iones de  $\text{Na}^+$  provoca un aumento en la presión de turgencia y toxicidad intracelular. Esto dispara a nivel molecular una cascada de eventos que tienen como finalidad restablecer la homeostasis iónica y el equilibrio osmótico de la célula. A nivel fisiológico la planta realiza una serie de cambios para hacer frente al aumento de potencial osmótico del medio. Si la planta es incapaz de hacer frente a este nuevo escenario aparecen lesiones en forma de necrosis y clorosis y un retraso o un bloque total del crecimiento normal de la planta, que en última instancia puede llegar a la muerte. Esta reducción del crecimiento reduce la superficie expuesta para la transpiración por lo tanto, se reduce al mínimo la pérdida de agua. Las plantas también pueden acumular el sodio en las hojas más viejas, de las cuales luego se desprenden.

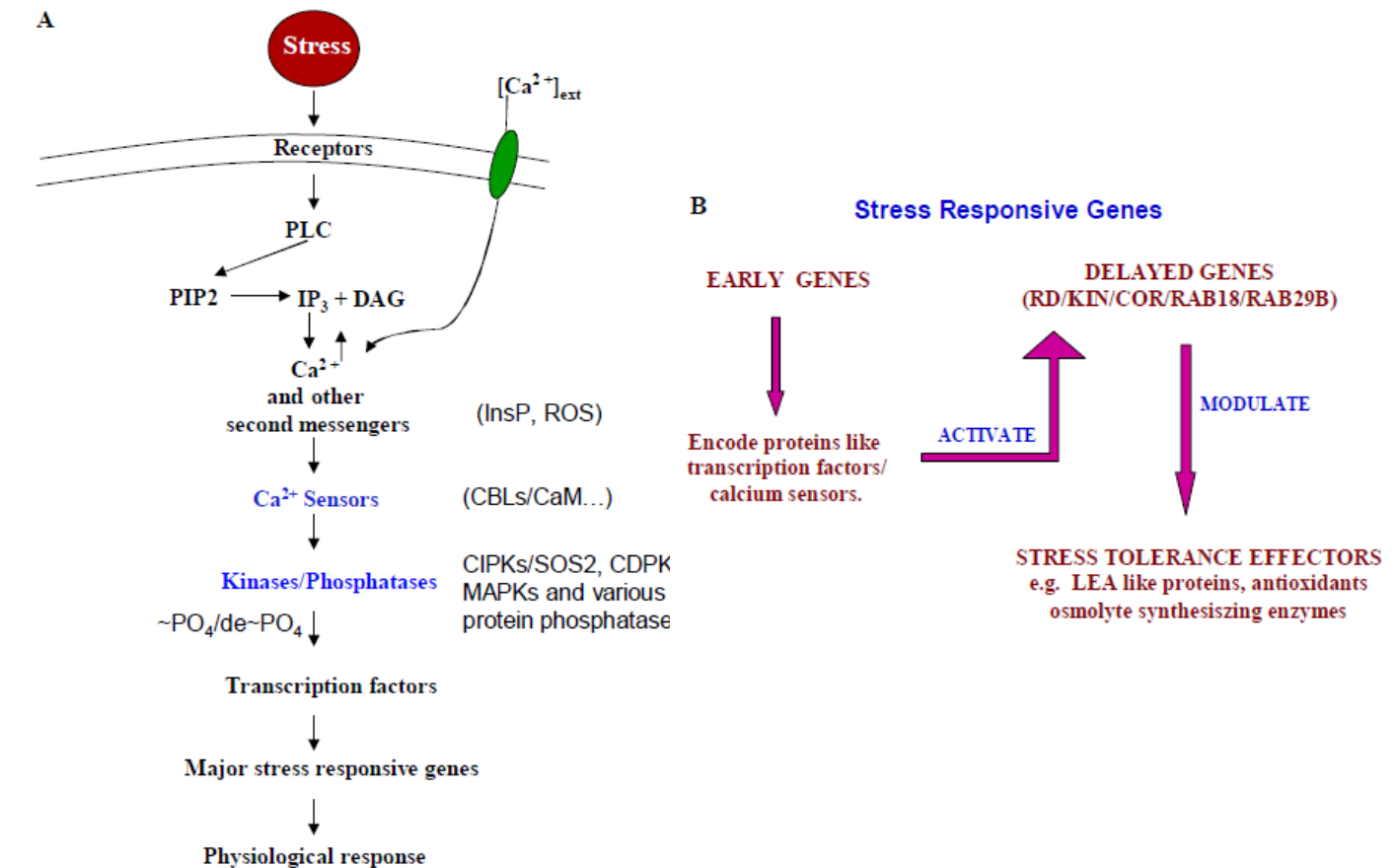
El estrés por frío causa principalmente la alteración de la integridad de la membrana celular que conduce a graves problemas de deshidratación y desequilibrio osmótico. La aclimatación al frío hace que se activen varios genes, que dan lugar a la reestructuración de las membranas celulares por el cambio en la composición lipídica y la generación de osmolitos, que previenen la deshidratación celular (Guy, 1990).



**Percepción del estrés a nivel celular: Vías de señalización**

A nivel molecular la respuesta de las plantas a estrés abiótico es muy compleja, y en gran parte desconocida. La ruta de respuesta a estrés mejor conocida es la del estrés por sequía, que en algunos aspectos se solapa con la respuesta a estrés por frío o salinidad. En condiciones de sequía el estrés es percibido por los receptores presentes en la membrana de las células vegetales (Fig. 1A), la señal es transducida por la ruta de señalización y da como resultado la liberación de segundos mensajeros como especies reactivas de oxígeno (ROS) y fosfatos de inositol. Estos segundos mensajeros modulan el nivel de calcio intracelular. En el citosol, esta perturbación es detectada por proteínas con dominios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente del tipo calmodulina o C2. Estos sensores carecen de actividad enzimática, pero cambian su conformación de forma dependiente del calcio. Estas proteínas interactúan con sus respectivas dianas y desencadenan una cascada de fosforilación con el objetivo de activar, a nivel de expresión o postraduccional, los genes de respuesta a estrés. Los productos de estos genes conducen a la planta a una adaptación y la ayudan a sobrevivir y superar las condiciones desfavorables. Los cambios en la expresión de los genes inducidos por el estrés, a su vez, participan en la generación de hormonas como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico y etileno. Estas moléculas pueden amplificar la señal inicial y poner en marcha una segunda ronda de señalización que puede seguir la misma vía de acción o modificarla. Algunas moléculas conocidas como accesorias no participan directamente en esta respuesta pero lo hacen en la modificación o ensamblaje de los componentes principales. Actúan mediante la miristoilación, glucosilación, metilación y ubiquitinación de dichos componentes.

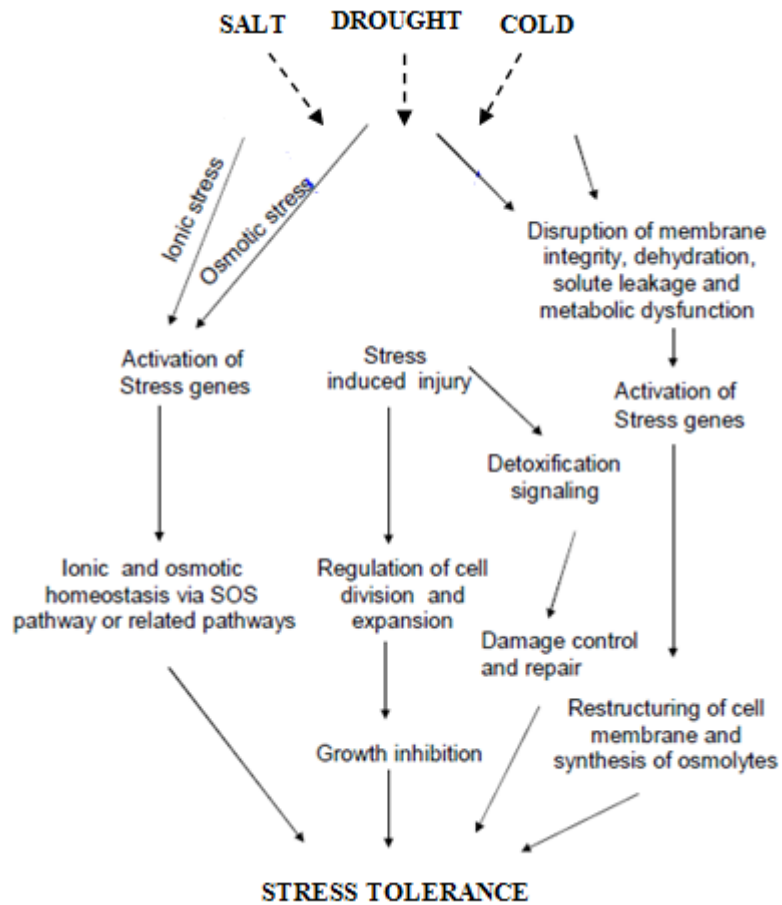
Los genes de respuesta a estrés pueden ser catalogados como de respuesta temprana o tardía (Fig. 1B). Los primeros son genes inducidos a los pocos minutos de percibir la señal y se expresan de forma transitoria. Normalmente los factores de transcripción se incluyen en la lista de genes tempranos, ya que la inducción de estos genes no es a nivel transcripcional sino de modificación postraduccional, generalmente fosforilación defosforilación o unión a calcio. Por el contrario, el resto de genes que son activados más lentamente (horas después de la percepción de la señal) se denominan de respuesta tardía. Algunos de estos genes son del tipo RD (respuesta a la deshidratación), KIN y COR (respuesta a frío), los cuales codifican y modulan la síntesis de proteínas necesarias, por ejemplo, proteínas LEA, antioxidantes, proteínas estabilizadoras de membrana y síntesis de osmolitos (Mahajan et al., 2005). En condiciones de sequía o de salinidad muchos de estos genes de respuesta tardía tienen como función restablecer la homeostasis de iones o la presión de turgencia.



**Figura 1.** Ruta genérica de transducción de la señal y expresión de genes tempranos y tardíos en respuesta al estrés abiótico.

(A) La señal es percibida por el receptor de membrana que activa el PLC e hidroliza PIP2 para generar IP3 y DAG. Los niveles de calcio citoplasmático son regulados por los movimientos de iones  $\text{Ca}^{2+}$  del apoplasto o de su liberación a partir de fuentes intracelulares mediada por IP3. Este cambio en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma es detectado por los sensores de calcio que interactúan aguas abajo con los componentes de señalización que pueden ser quinasas y / o fosfatasa. Estas proteínas afectan a la expresión de los genes de respuesta a estrés que producen las respuestas necesarias.

(B) Los genes de respuesta temprana son inducidos a los pocos minutos de percibir la señal y se expresan de forma transitoria. Mientras que los de respuesta tardía, son activados más lentamente (horas después de la percepción de la señal) (Mahajan *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Ruta de señalización genérica del estrés por sal, sequía y frío. La salinidad y la sequía perturban el equilibrio iónico y osmótico de la célula. Esto desencadena el proceso de restablecer la homeostasis que conduce a la tolerancia a dicho estrés. Estas adversidades provocan lesiones en la fisiología celular y dan lugar a la disfunción metabólica, alterando el ciclo celular y por tanto del correcto crecimiento de la planta. Las lesiones y la generación de ROS provocan una señal de detoxificación que activa a los genes responsables del control y reparación de los daños. El enfriamiento ejerce su efecto en la ruptura de la membrana y la liberación de los solutos. Además, otros factores fisiológicos tales como la tasa de fotosíntesis, la concentración de proteínas y los procesos metabólicos generales se ven seriamente comprometidos. La aclimatación al frío tiene como respuesta la reestructuración de las membranas celulares y la síntesis de diferentes osmolitos, para restaurar el funcionamiento normal y hacer frente a al estrés (Mahajan *et al.*, 2005).

## 1.2 Transporte de iones en plantas

Como hemos dicho anteriormente, la salinidad afecta a cada aspecto de la fisiología de la planta y su metabolismo. El estrés salino rompe la homeostasis iónica, la cual la definimos como el **conjunto de fenómenos de autorregulación** que llevan al mantenimiento de la constancia en las propiedades y la composición del medio interno de un organismo.

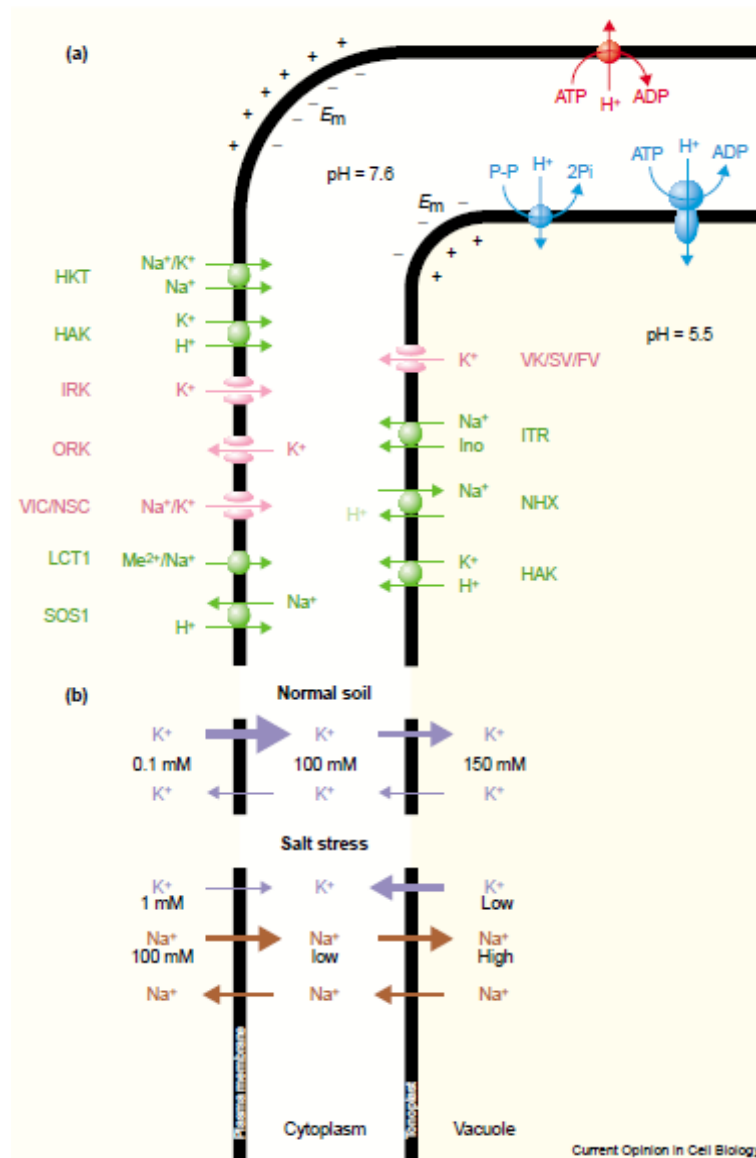
### **La captación de sodio.**

Estudios electrofisiológicos han demostrado que los llamados canales de cationes monovalentes dependientes de voltaje (VIC) son responsables de la mayor parte del flujo de  $\text{Na}^+$  de las células vegetales (White, 1999). Desafortunadamente la identidad molecular de estos canales se desconoce. El hecho de que la absorción de  $\text{Na}^+$  es en gran parte inhibida por cationes divalentes (White, 1999) puede sugerir que los canales CIV corresponden a canales de cationes divalentes.

La proteína de trigo LCT1 es un buen candidato para este canal, ya que media la captación de cationes divalentes como calcio y cadmio en levadura (Clemens *et al.*, 1998). Sin embargo, una actividad como el VIC no se ha demostrado para LCT1. Otro candidato para mediar la captación de  $\text{Na}^+$  son miembros de la familia de los transportadores de potasio HKT, que exhiben diferentes grados de actividad de transporte de  $\text{Na}^+$  (Rubio *et al.*, 1999).

### **Flujo de salida de sodio.**

Los mecanismos de detoxificación de  $\text{Na}^+$  en células vegetales son más conocidos. Por ejemplo, la ganancia de función del gen NHX1, que codifica un antiportador vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , mejora la tolerancia a la sal (Apse *et al.*, 1999). Mientras que la pérdida de función de un gen antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática (SOS1) reduce dicha tolerancia (Shi *et al.*, 2000). NHX1 y SOS1 son proteínas que pertenecen a una familia de antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  identificados previamente en animales (antiportadores NHE), bacterias (antiportadores Nha) y en levadura (antiportadores Sod2/Nha1 y Nhx1) (Shi *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Transportadores y flujos de  $K^+$  y  $Na^+$  en células vegetales.

(a) La ATPasa P bombeara de  $H^+$ , mostrada en rojo en la parte superior del sistema, energiza la membrana plasmática, desarrollando un potencial de membrana que puede variar entre -100 y -200 mV y un gradiente de pH de 2-3 unidades. Bajo el efecto del potencial eléctrico y en ocasiones del gradiente de pH, varios transportadores (verde) y canales (rosa) median los movimientos de  $K^+$  y  $Na^+$  a través de la membrana plasmática. Una ATPasa V que bombea protones y una pirofosfatasa bombeara de protones (azul) energiza el tonoplasto desarrollando un potencial de membrana entre -80 y -20 mV, y un gradiente de pH de 1-2 unidades. Bajo el efecto de estos potenciales muchos transportadores (verde) y canales (rosa) median el flujo de  $K^+$  y  $Na^+$  a través del tonoplasto.

(b) En células no estresadas  $K^+$  es tomado del medio externo y acumulado en el citoplasma y en la vacuola, una parte de estos iones potasio serán devueltos al medio externo mediante un flujo de salida habitual o durante el ajuste osmótico de la célula; estos flujos son mediados por canales, pero la existencia de antiportadores  $K^+/H^+$  son también probables. La presencia de 100 mM de  $Na^+$  en el medio externo inhibe la captación de  $K^+$  mediada por HKT, HAK y IRK; y desencadena un flujo de  $Na^+$  mediado por HKT, VIC/NSC y LCT1.  $Na^+$  puede volver al medio externo vía tonoplasto gracias a la mediación de ITR, y la membrana plasmática a través de SOS1 (Serrano and Rodríguez Navarro, 2001).

### Regulación de la homeostasis de iones.

Como muestra la figura 3b, durante el estrés salino el sodio asimilado por la célula debe ser liberado a la membrana plasmática o compartimentalizado en la vacuola. Para ello es necesaria una regulación de los transportadores  $\text{Na}^+$  del tonoplasto y la membrana plasmática.

La expresión de los transportadores de  $\text{Na}^+$  de *Arabidopsis* SOS1 (Shi *et al.*, 2000) y NHX1 es inducida por el estrés salino. NHX1 también es inducido por el ácido abscísico, una hormona mediadora de las respuestas al estrés por sequía. La señalización se produce por la vía dependiente o independiente del ácido abscísico. Varios factores de transcripción (del tipo MYC, bZIP y AP2) y promotores de los elementos (ABRE y DRE) se han identificado para ambas vías. La enzima dioxigenasa 9-cis-epoxycarotenoide es la enzima reguladora clave en la biosíntesis del ácido abscísico inducido por el estrés osmótico (Cutler and Krochko, 1999).

Los pasos de estas vías de señalización no han sido caracterizados todavía. El estrés osmótico en levaduras es detectado por dos proteínas de la membrana plasmática, la histidina quinasa de “dos componentes” Sln1 y la proteína Sho1, las cuales activan la MAP quinasa quinasa quinasa Ssk2/Ssk22 y Ste11, respectivamente. La señal procede de la MAP quinasa quinasa Pbs1 a la MAP quinasa Hog1, que regulan varios genes de defensa incluidos genes transportadores. Hay una evidencia preliminar en plantas que la histidina quinasa ATHK1 opera de forma similar a Sln1/Hog1 en levadura. ATHK1 expresada en levadura puede reemplazar funcionalmente la histidina quinasa Sln1. Finalmente, MAP quinasas de alfalfa (SIMK) (Munnik *et al.*, 1999), tabaco (SIPK) (Mikolajczyk *et al.*, 2000) y *Arabidopsis* (ATMPK4 y ATMPK6) (Ichimura *et al.*, 2000) son activadas por estrés osmótico.

Además de la regulación directa del estrés osmótico mediado por histidinas quinasas de membrana y MAP quinasas, hay una vía de regulación más indirecta mediada por el incremento del calcio citoplasmático que regula la sequía y las respuestas al estrés osmótico en plantas (Knight *et al.*, 1997). La importancia de esta vía queda definida porque la ganancia de función de un antiportador vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  en tabaco disminuye la tolerancia al estrés (Hirschi, 1999), probablemente por la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre. Un mecanismo que aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  parece implicar a la producción del inositol -1, 4,5- trifosfato y la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de la vacuola (Knight *et al.*, 1997, Drobak and Watkins., 2000).

La señal  $\text{Ca}^{2+}$  es percibida por proteínas quinasas que contienen un dominio  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CDPKs) (Harmon *et al.*, 2000) o, como en el caso de SOS2, una subunidad del tipo SOS3. La importancia de la primera vía de  $\text{Ca}^{2+}$  es debida a la observación de que la sobreexpresión de un CDPK confiere tolerancia a la sal en arroz. Para la segunda vía de  $\text{Ca}^{2+}$ , es una evidencia genética que la expresión del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1, está regulado por sal por el complejo proteína quinasa activado SOS2–SOS3  $\text{Ca}^{2+}$  (Shi *et al.*, 2000). El factor de transcripción involucrado en esta regulación

no es conocido y no queda claro si la actividad de transporte de la proteína SOS1 está también regulada. La N-miristoilación de SOS3 hace posible que el transportador esté directamente regulado en la membrana plasmática. En plantas la ruta de señalización dependiente de Calcio se basa en protein quinasas, a diferencia de la que opera en levadura, dependiente de la protein fosfatasa calcineurina. Es sorprendente, sin embargo, que la expresión de la calcineurina de levadura en plantas mejora la tolerancia a la sal (Pardo *et al.*, 1998; Marín-Manzano *et al.*, 2004)).

### 1.3 Levaduras como organismo modelo

Uno de los sistemas más utilizados para estudiar el transporte de iones y la tolerancia a estrés abiótico en plantas es la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*. Es un sistema eucariota, con una complejidad superior a la de la bacteria pero compartiendo con ella muchas de sus ventajas técnicas. Además de su rápido crecimiento, dispersión de las células y facilidad con la que se replican cultivos y se aíslan mutantes, destaca por su sencillo y versátil sistema de transformación con ADN exógeno. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones.

Una ventaja adicional de este microorganismo consiste en que se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión. Ello ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes que codifica el genoma de levadura, el diseño de micromatrices de ADN y poder realizar estudios a nivel de todo el organismo. Entre otros muchos aspectos, de la expresión génica, localización de proteínas y la organización funcional del genoma y el proteoma.

La maquinaria molecular de muchos procesos celulares se encuentra conservada tanto en levadura como en plantas y en mamíferos. Esto se ilustra con el hecho de que rutinariamente se han introducido genes de eucariotas superiores en levadura para el análisis sistemático de su función.

Por estas razones *S. cerevisiae* se ha convertido en una importante herramienta de análisis molecular, proporcionando un punto de partida para el análisis de organismos eucariotas más complejos. Al ser un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, la levadura se puede utilizar para los estudios de células que resultarían muy complicados o costosos en organismos multicelulares.

## 1.4 Transporte de iones en levadura

Los cationes de metales alcalinos tienen un papel importante en fisiología celular por ser los principales responsables de crear el ambiente iónico en el que se llevarán a cabo todos los procesos moleculares en el medio interno celular. Esto explica a que los mecanismos que regulan sus homeostasis despertaran el interés de los científicos en los albores de la fisiología celular, y posteriormente a nivel de biología molecular.

Aunque la mayoría de las levaduras no encuentran altas concentraciones de sodio en sus hábitats naturales, se pueden enfrentar a situaciones en las que aparezcan cantidades de sodio en el medio. En estas circunstancias, las células usan una gran cantidad de energía para acumular grandes cantidades intracelulares de  $K^+$  y mantener baja la concentración citosólica de  $Na^+$ . El potasio es necesario para muchas funciones fisiológicas, como la regulación de la célula, su volumen y el pH intracelular, el mantenimiento de la estabilidad, el potencial de la membrana plasmática, la compensación de las cargas negativas en muchas macromoléculas, la síntesis de proteínas y la activación enzimática. *S. cerevisiae* es capaz de crecer en presencia de una amplia gama de concentraciones externas de  $K^+$  (10  $\mu$ M a 2,5 M) y  $Na^+$  (< 1,5 M). Algunas especies no convencionales de levadura son halotolerantes, por lo que pueden crecer en medios casi saturados de sal.

Para mantener una óptima concentración intracelular de los iones de potasio y el ratio intracelular  $K^+/Na^+$  alto y estable las células de levadura emplean tres estrategias distintas: (1) la discriminación estricta entre cationes de metales alcalinos (transportadores muestran mayor afinidad por el potasio que por el sodio), (2) un eficiente flujo de salida de sustancias tóxicas o superávit de cationes en las células, y (3) el secuestro selectivo (compartimentación) de cationes en los organelos (Rodríguez-Navarro, 2000).

### **Aspectos generales de la homeostasis de cationes de metales alcalinos.**

El alto contenido de potasio en las células de levadura corresponde al estado estacionario entre la entrada y la salida del flujo en la membrana plasmática, esta circulación continua es necesaria para las funciones fisiológicas básicas. La coordinación entre la entrada de potasio y los sistemas de flujo de salida son necesarios para el mantenimiento del potencial a través de la membrana plasmática. Considerando que la ausencia de los sistemas de captación de potasio provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática, y la supresión de los sistemas de salida causan una despolarización.

En presencia, de baja concentración extracelular de sodio, la vía de captación de potasio domina la de sodio. Cuando el ratio  $Na^+/K^+$  extracelular supera un valor de 700:1 (Rodríguez-Navarro and Ramos, 1984) el sodio entra de forma significativa, y sustituye al potasio. La concentración intracelular de cationes de potasio en *S. cerevisiae* en condiciones de crecimiento normales varía de 200 a 300 mM (dependiendo de la cepa y



del medio) y disminuye con la entrada de sodio. Tan pronto como la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  se aproxima a la de  $\text{K}^+$ , el crecimiento de células se inhibe, y con el aumento de sodio las células mueren. Para sobrevivir a las altas concentraciones externas de sodio, las células deben hacer frente a la pérdida de agua causada por el choque osmótico. Además de la participación de transportadores de membrana plasmática, antiportadores intracelulares, principalmente Vnx1 y Nhx1, desempeñan un importante papel en la disminución de la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  ya que ayudan a secuestrar cationes tóxicos de sodio en la vacuola, donde el suministro intracelular de potasio se mantiene normal. El transporte y almacenamiento de los cationes de metales alcalinos en la vacuola sirve no sólo para asegurar concentraciones óptimas de potasio o disminuir la cantidad de sodios tóxicos en el citosol, sino también para compensar las cargas negativas de polifosfatos vacuolares (Klionsky *et al.*, 1990).

### **Transporte a nivel de membrana plasmática.**

#### **La captación de potasio.**

Los genes que codifican los dos transportadores principales implicados en la captación de potasio en *S. cerevisiae* son: Trk1 y Trk2 (Gaber *et al.*, 1988, Ko *et al.*, 1990). Trk1 (YJL129c) fue el primer gen aislado y estudiado que codifica a un transportador  $\text{K}^+$  en células eucariotas no animales y fue clonado gracias a su capacidad para suprimir el defecto del transporte de potasio en células mutantes en Trk1 en levadura. Trk1 codifica una proteína de membrana de 180 KDa, constituida por 1235 aminoácidos, para los cuales el análisis de hidrofobicidad predice 12 dominios que atraviesan la membrana (Gaber *et al.* 1988). Más tarde fueron identificados ortólogos de Trk1 en otras levaduras, hongos y plantas superiores (Rodríguez-Navarro, 2000). Trk1 (Fig. 4), es una proteína integral de la membrana plasmática localizada en unos dominios enriquecidos con glicolípidos formando una plataforma para el transporte de lípidos y proteínas.

TRK1 no es esencial en *S. cerevisiae*. Las células haploides que contienen un alelo nulo, queda reducida su eficiencia de la actividad del transporte de potasio (Gaber *et al.*, 1988). En células silvestres, crecen a concentraciones bajas de potasio y tienen un transporte con alta velocidad y afinidad por  $\text{K}^+$  y  $\text{Rb}^+$ . Los mutantes en *trk1* muestran un problema de crecimiento a bajas concentraciones de potasio debido a la pérdida de eficiencia del transporte de  $\text{K}^+$  (Ariño *et al.*, 2010).

Trk2 (YKR050w) es el segundo gen Trk en *S. cerevisiae*. Codifica una proteína más corta (889 aminoácidos) y es idéntica al 55% a Trk1 en su secuencia general. También contiene 12 supuestos dominios transmembrana (Ko *et al.*, 1990) dispuestos en cuatro segmentos MPM, cuya identidad a los de Trk1 se eleva a 70- 90%. La diferencia principal entre Trk1 y Trk2 se encuentra entre el primer y segundo motivo MPM. En Trk1, el bucle contiene 642 aminoácidos mientras que en Trk2 el segmento intracelular es mucho más corto (326 aminoácidos). Curiosamente, la mayoría de los genes identificados en otras TRK de levaduras están más estrechamente relacionados con Trk2 que con Trk1.

Existe una relación entre los genes TRK y los diferentes tipos de transporte de potasio. En una cepa silvestre, la mayoría de los flujos de potasio están mediados por Trk1, el cual puede trabajar como un transportador de alta o baja afinidad en función de las condiciones de crecimiento y el estado de potasio de la célula. Así, las células silvestres con crecimiento sin limitaciones de potasio mostrarían el transporte de baja afinidad, pero después de un ayuno de este elemento activan los sistemas de alta afinidad. Trk2 puede transportar también potasio con una alta afinidad, pero este gen está muy poco expresado en condiciones normales. Su actividad se ve afectada por la presencia de Trk1. Finalmente, en cepas que carecen de los dos transportadores, se hace evidente la existencia de un transporte de potasio ectópico (Ariño *et al.*, 2010).

Junto con el sistema de transporte de potasio dependiente de TRK, existe un sistema de transporte de baja afinidad denominado NSC1 (canal inespecífico de cationes) (Fig. 4). Este transporte fue identificado a nivel electrofisiológico en células mutantes para los genes Trk1 y Trk2. El gen responsable de este transporte no ha sido identificado todavía, aunque este canal parece explicar los procesos de asimilación de potasio de muy baja afinidad en dichos mutantes. Su actividad está bloqueada por una concentración mili molar de calcio y otros iones metálicos divalentes. Se desbloquea al disminuir la cantidad extracelular de metales divalentes libres por debajo de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y es independiente de otros transportadores de potasio como Tok1, Trk1 y Trk2. Éste podría rectificar la inhibición del crecimiento de la levadura producida por la interrupción de sus transportadores de potasio. Más tarde, fue propuesto como la ruta principal de captación de iones potasio de baja afinidad en levadura. Los factores que suprimen el canal NSC1 son la alta concentración de calcio, bajo pH extracelular, higromicina B y, en menor medida, tetraetilamonio.

### **Salida (flujo) de potasio.**

La existencia del flujo de salida de potasio en *S. cerevisiae* se conoce desde hace mucho tiempo. Hoy en día, existen al menos tres transportadores diferentes que pueden contribuir al flujo de salida de potasio, en condiciones fisiológicas. Dos de ellos fueron inicialmente identificados como sistemas de salida de sodio, pero también son capaces de mediar transporte de potasio (Ena1 y Nha1). El tercero, es el único sistema específico de salida de potasio en *S. cerevisiae*: Tok1 (Fig. 4).

Tok1 es el único canal presente en la membrana plasmática de células de levadura que transporta al exterior los iones de potasio. Tiene 691 aminoácidos, y su secuencia y corresponde a una proteína del canal con ocho dominios transmembrana y dos bucles del tipo P que forman el poro. La pauta abierta de lectura (ORF) de TOK1 (YJL093c) se conoce también como YKC1, DUK1, YORK, y YPK1 (Ariño *et al.*, 2010).

Los dos dominios P son comunes a los canales iónicos selectivos de potasio. Cada uno de los poros forma un canal funcional permeable a potasio y la cola carboxilo funciona como cierre del canal sensible a voltaje. Tok1 se activa por la despolarización de la membrana plasmática y que el  $\text{K}^+$  acumulado en las células es probablemente liberado con el fin de regenerar el potencial de membrana. De hecho, la relación entre la

regulación y el potencial de membrana ha confirmado la observación original que los mutantes *tok1* se despolarizan y las células que sobreexpresan TOK1 son hiperpolarizadas.

### **La captación de sodio.**

En el genoma de levadura no aparece ningún transportador específico de sodio. El catión entra de forma significativa en la célula sólo si hay una elevada concentración externa. Se propuso la existencia de unos transportadores (Conway and Duggan, 1958) de cationes de metales alcalinos en conjunto y se reforzó cuando se vio que el sodio se unía al sitio de activación del transportador de potasio, afectando al transporte de  $Rb^+$  y  $K^+$ . El sodio inhibe competitivamente la captación de potasio en las células silvestres y por tanto *Trk1* debe aceptar y transportar tanto  $Na^+$  como  $K^+$ , aunque con una afinidad mucho más baja. Las células mutantes en *trk1* y *trk2* acumulan más  $Na^+$  y menos  $K^+$  que las células salvajes, lo que sugiere que la baja afinidad y los transportadores inespecíficos que actúan en estas células no discriminan entre  $Na^+$  y  $K^+$ . Es importante señalar que, en ausencia de calcio, el canal mencionado NSC1 anteriormente también transporta sodio o litio. A pesar de no haberse identificado un transportador específico de sodio sí que existe un cotransporte dependiente de sodio. Los genes PHO84 y PHO89 se encontró que codificaban dos cotransportadores de fosfato de alta afinidad localizados en la membrana plasmática. Pho84 cataliza el transporte de fosfato a pH ácido y Pho89 el transporte de fosfato dependiente de sodio a pH alcalino (Persson *et al.*, 1998). Pho89 representa el único sistema secundario de transporte de aniones acoplado a  $Na^+$  en *S. cerevisiae* identificado hasta el momento.

### **Salida (flujo) de sodio.**

Para mantener una baja concentración de cationes de sodio citosólico tóxicos (o de litio), las células de *S. cerevisiae* utilizan dos tipos de sistemas flujo de salida en su membrana plasmática. Como se señalaba anteriormente, mientras que estos sistemas se complementan entre sí en función de la desintoxicación, difieren en el mecanismo de transporte y regulación de ambos, su expresión y actividad (Fig. 4).

Ena ATPasas. Son ATPasas tipo P acopladas a la hidrólisis de ATP para el transporte de cationes en contra de gradientes electroquímico. Hay 5 subtipos, el subtipo IID, ejemplificado por el sistema ENA, corresponde a una subfamilia de ATPasas capaz de extruir  $Na^+$ ,  $Li^+$  o  $K^+$ . ENA1 fue propuesto inicialmente para codificar una supuesta ATPasa tipo P de calcio, y el locus fue nombrado PMR2, aunque un vez establecida como transportador de cationes monovalentes la denominación ENA1 (por **E**xtrusion of **Na**) es la que se ha impuesto. Cabe destacar que en *S. cerevisiae* estos genes se encuentran por lo general en repeticiones en tándem en el cromosoma IV. El número de copias varía de cepa a cepa, aunque en las cepas de laboratorio más comunes hay 4 copias, siendo ENA1 la responsable de la mayor parte del transporte debido a ser la que se expresa mayoritariamente (Ariño *et al.*, 2010).

El grupo ENA (en particular ENA1), es un determinante importante de tolerancia de sodio en *S. cerevisiae*. Su supresión da como resultado una fuerte sensibilidad a los

cationes de sodio y litio y un defecto de crecimiento significativo en pH alcalino, mientras que la expresión de ENA1 restaura la tolerancia a estos cationes. Además, la expresión de ENA1 de *S. cerevisiae* en otros hongos, como *Schizosaccharomyces pombe*, o en las células vegetales aumenta la tolerancia al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  y disminuye el contenido intracelular de estos cationes.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas Ena conduce a la predicción de 9 ó 10 dominios transmembrana, y su presencia en la membrana plasmática se ha demostrado para *S. cerevisiae* Ena1 y Ena2 y para *Debaryomyces* (antes *Schwanniomyces*) *occidentalis*.

Antiportador Nha1. A pesar de que los sistemas de transporte, entre ellos, los antiportadores de la membrana plasmática de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  se encuentran conservados en muchos tipos de organismos (identificado hasta el momento en, por ejemplo, *archaea*, bacterias, hongos, parásitos, insectos, plantas y mamíferos), sus estructuras, especificidades de sustrato, y las funciones probables celulares han divergieron durante su evolución. Aunque la mayoría de los microorganismos y las plantas utilizan el gradiente de protones hacia el interior creado por la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática para bombear cationes de sodio al exterior, las células animales por lo general consumen el gradiente de  $\text{Na}^+$  de la actividad resultante de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPasa con el fin de extraer protones y regular el pH intracelular.

El antiportador Nha1 es el responsables del crecimiento de células con altas concentraciones de KCl y NaCl en valores de pH ácidos externo. Además tiene un papel fundamental en la extracción de iones sodio y potasio gracias al potencial creado por la entrada de protones. Tiene otras funciones como son: mantenimiento del pH intracelular, la regulación del ciclo celular, el volumen celular, o potencial de membrana.

Nha1 es muy estable, con una vida media de más de 6 horas. Los estudios bioquímicos revelaron que se encuentra muy probablemente presente en las membranas como un dímero y la interacción de los monómeros es importante para la actividad, y que se localiza predominantemente en regiones de la membrana ricos en detergentes y ergosterol. Es una proteína típica de membrana formada por 985 residuos de aminoácidos de largo, tiene un corto N terminal hidrofílico con orientación citosólica, seguido de 12 segmentos hidrofóbicos transmembrana y termina con una repetición C terminal larga hidrofílica. La mayoría de las funciones conocidas de Nha1 en fisiología celular antes mencionados están relacionadas con su C terminal hidrofílico muy largo, lo que representa aproximadamente el 56% de la proteína total.

En resumen, la principal función fisiológica de Nha1 en *S. cerevisiae* es el reciclaje continuo de los cationes de potasio a través de la membrana plasmática. Su contribución a la desintoxicación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  cationes es importante, pero no crucial. Nha1 parece participar más activamente, a través de su capacidad de transporte de potasio, en la homeostasis del potasio intracelular y el pH y, en consecuencia, en la respuesta rápida a

los cambios de la osmolaridad externa, al ajuste del volumen celular, y al mantenimiento del potencial de la membrana. Es probable que en todas estas funciones fisiológicas, el antiportador Nha1 esté vinculado a la actividad de la Trk1 y Trk2, como se ha demostrado que la supresión de Nha1 afecta a la cinética de la captación de potasio de alta afinidad a través de sistemas Trk y, viceversa, que la supresión de Trk1 y 2 da como resultado un flujo de entrada de potasio disminuido (Ariño *et al.*, 2010).

### **Transporte intracelular de cationes**

La concentración de cationes de metales alcalinos dentro de las células de levadura es probablemente no homogénea, y hay una diferencia en el de sodio y / o cantidades de potasio en el citosol y en orgánulos individuales. La necesidad fisiológica del transporte de cationes de metales alcalinos a través de las membranas de los orgánulos está conectada al mantenimiento de la homeostasis de potasio y desintoxicación de sodio en el citosol, así como a la regulación del pH y el volumen. Hasta ahora, el mecanismo antiportador de intercambio de protones de cationes de sodio y potasio ha sido descrito en cuatro orgánulos de *S. cerevisiae*. En el aparato de Golgi Kha1, en la vacuola Vnx1, en el endosoma Nhx1 y en la mitocondria Mdm38. Estos crean gradientes de protones entre las membranas de los orgánulos y el citosol (Fig. 4).

### **Transporte a través de la membrana mitocondrial interna.**

Aunque el intercambio de potasio y de protones a través de las membranas mitocondriales ya había sido predicho por Peter Mitchell, el gen MDM38/MKH1/YOL027c, cuyo producto se localiza en la membrana mitocondrial interna, sea demostrado que es indispensable para el intercambio  $K^+/H^+$ . MDM38, que está bien conservada entre todos los eucariotas, fue aislado en una pantalla de genes implicados en la homeostasis mitocondrial de cationes. Las mitocondrias aisladas de mutantes con la supresión de *mdm38* muestran un intercambio  $K^+/H^+$  muy reducido, con un potencial de membrana bajo, alto contenido en potasio y un aumento del volumen de la matriz. Los análisis revelaron que tras la pérdida de este transportador se producía una hinchazón mitocondrial, la reducción del potencial de membrana, seguida por la fragmentación mitocondrial y en consecuencia la captación del material mitocondrial en las vacuolas.

Todo esto confirma el importante papel del intercambiador  $K^+/H^+$  en la fisiología mitocondrial, pero sin embargo la identificación de la molécula transportadora sigue abierta. Se han identificado recientemente otras dos proteínas que pueden desarrollar un papel en este proceso, son Mrs7 y Ydl183.

**Transporte vacuolar.**

La vacuola es el lugar donde las células secuestran el sodio tóxico y almacenan una parte sustancial del potasio intracelular.

Uno de los principales antiportadores que residen en la membrana vacuolar es el Vnx1, es indispensable para el intercambio de sodio y potasio entre la vacuola y el citosol. Además del secuestro de metales alcalinos en el lumen vacuolar, también desempeña un papel en la homeostasis citosólica de iones y la regulación de la distrofina (proteína necesaria para la estabilidad mecánica de las células musculares), similar al caso de los transportadores Nha1 y Nhx1.

**Endosomas y aparato de Golgi.**

Kha1. Entre los tres antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , Kha1 (codificada por YJL094c) tiene el más alto nivel de similitud con el antiportador bacteriano de sodio o potasio/protones. Se localiza en la membrana del aparato de Golgi. Al igual que en el caso de otros transportadores intracelulares de cationes de metales alcalinos /  $\text{H}^+$  de levaduras, se cree que está involucrado en la regulación del potasio en el interior del orgánulo y la homeostasis del pH.

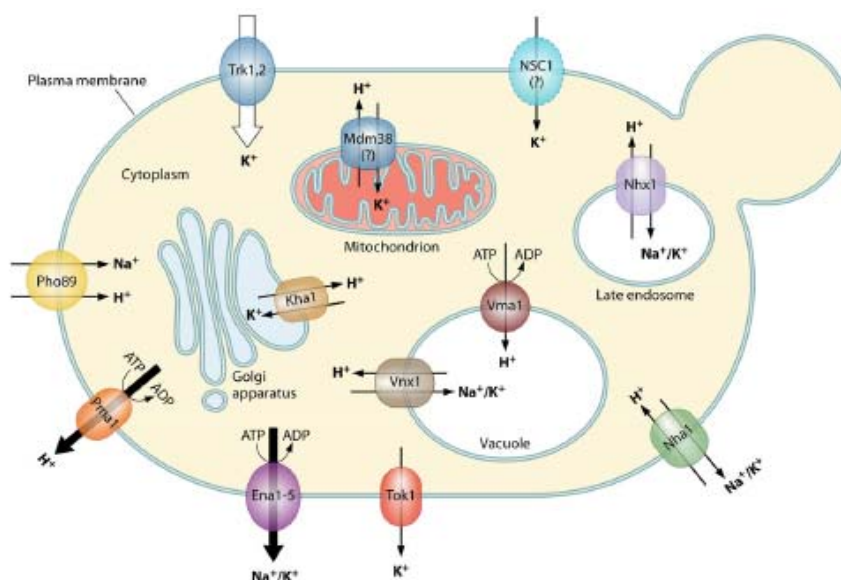
Nhx1. Codificado por YDR456w, fue el primer antiportador intracelular descubierto en levaduras y es el mejor caracterizado. Fue identificado en la caracterización de los fenotipos tolerantes  $\text{Na}^+$  de la ATPasa- $\text{H}^+$  del mutante *pma1- $\alpha$ 4* y se ha demostrado que se localiza en la membrana de los compartimentos prevacuolares, por ejemplo, en los endosomas tardíos. La supresión del gen NHX1, provoca un incremento de la sal y mayor sensibilidad de las células al bajo  $\text{pH}_{\text{externo}}$  junto con un descenso del pH citosólico. La delección del gen NHX1 en un fondo que carece de la membrana plasmática y transportistas Nha1 y Ena1-4 produce una extrema sensibilidad no sólo a  $\text{Na}^+$  sino también a  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{Rb}^+$ , lo que sugiere la amplia especificidad de este antiportador (Nass *et al.*, 1997).

Nhx1 como el transportador Nha1 de la membrana plasmática tiene múltiples funciones. Contribuye al secuestro de los cationes de sodio y de litio tóxicos, así como los excedentes de potasio, en los endosomas y vacuolas, y está involucrado en la etapa temprana de la célula a la adaptación a un choque hiperosmótico. Además, su actividad contribuye significativamente al mantenimiento de una estabilidad intracelular del pH, y su presencia es necesaria para el tráfico de las proteínas entre los endosomas y otros organelos.

Homólogos de Nhx1 se conservan en plantas y en mamíferos y su estructura primaria tiene un alto grado de similitud con las familias NHE y NHA/SOS de la membrana plasmática y los intercambiadores intracelulares  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de células de mamíferos y plantas respectivamente.

La disposición de datos sugieren que los antiportadores Nhx1 y Kha1, junto con la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar, están involucrados en el pH intraorganelar y el balance de cationes de metales alcalinos, que a su vez, influye en el tráfico de vesículas entre la secreción de orgánulos y la vía endosomal (Ariño *et al.*, 2010).

Todos estos transportadores vistos hasta ahora quedan reflejados en la tabla 1.



**Figura 4.** La membrana plasmática y el transporte intracelular de cationes en *S. cerevisiae* (Ariño *et al.*, 2010).

TABLE 1. Alkali metal cation transporters in *S. cerevisiae*

Name	ORF	YETI no. <sup>a</sup>	Localization <sup>b</sup>	Transporter type	Length (aa)	No. of TMS	Substrate specificity <sup>c</sup>	Main function	Reference
Trk1	YJL129c	2.A.38.2.1	PM	Uniporter	1,235	12	<b>K<sup>+</sup></b> , Rb <sup>+</sup>	K <sup>+</sup> uptake	82
Trk2	YKR050w	2.A.38.2.1	PM	Uniporter	889	12	<b>K<sup>+</sup></b> , Rb <sup>+</sup>	K <sup>+</sup> uptake	128
Tok1	YJL093c	1.A.1.7.1	PM	Channel	691	10	<b>K<sup>+</sup></b>	K <sup>+</sup> efflux	116
Ena1	YDR040c	3.A.3.9.1	PM	ATPase	1,091	10	<b>Na<sup>+</sup></b> , <b>Li<sup>+</sup></b> , <b>K<sup>+</sup></b> , Rb <sup>+</sup>	Detoxification	102
Nha1	YLR138w	2.A.36.4.1	PM	Antiporter	985	12	<b>K<sup>+</sup></b> , <b>Na<sup>+</sup></b> , <b>Li<sup>+</sup></b> , Rb <sup>+</sup>	K <sup>+</sup> efflux	219
Pho89	YBR296c	2.A.20.2.2	PM	Symporter	574	10	<b>Na<sup>+</sup></b> , <b>P<sub>i</sub></b>	P <sub>i</sub> uptake	156
NSC1	Not known		PM	Channel	Not known	Not known	Monovalent + bivalent cations	Not known	30
Kha1	YJL094c	2.A.37.4.1	GA	Antiporter	873	12	<b>K<sup>+</sup></b> , <b>Li<sup>+</sup></b> , <b>Na<sup>+</sup></b>	Detoxification	153
Nhx1	YDR456w	2.A.36.2.1	LE	Antiporter	633	8 (?)	<b>Na<sup>+</sup></b> , Rb <sup>+</sup> , <b>K<sup>+</sup></b> , <b>Li<sup>+</sup></b>	Detoxification, vesicle trafficking	185
Vnx1	YNL321w	2.A.19.Y1.Z1	VAC	Antiporter	908	13	<b>Na<sup>+</sup></b> , <b>K<sup>+</sup></b>	Detoxification	37

<sup>a</sup> YETI, Yeast Transporter Information (55, 56), based on Transport Classification (TC) system (248).

<sup>b</sup> PM, plasma membrane; GA, Golgi apparatus; LE, late endosomes; VAC, vacuole.

<sup>c</sup> Bold, preferred substrate; italic, substrate predicted from phenotypic observations.

**Tabla 1.** Transportadores de cationes de metales alcalinos en *S. cerevisiae* (Ariño *et al.*, 2010). Esta tabla resume sus principales características.

**Papel de la H<sup>+</sup>-ATPasas en la homeostasis de cationes de metales alcalinos.**

La mayoría de las proteínas enumeradas anteriormente median el transporte por un mecanismo de antiporte, el intercambio de cationes de metales alcalinos por los protones. Por lo tanto, un gradiente de protones a través de membranas sirve como fuente de energía para bombear cationes de metales alcalinos en contra de sus gradientes. Sin embargo, en algunos casos (por ejemplo, alcalinización del citosol a pH externo alto), las células pueden utilizar el gradiente de potasio hacia el exterior a través de la membrana plasmática como una fuerza motriz para el transporte de protones en contra de su gradiente (Bañuelos *et al.*, 1998). En condiciones fisiológicas normales, los antiportadores secundarios activos localizados en la membrana plasmática y en la de los orgánulos dependen de la actividad de los transportadores primarios activos que acumulan el gradiente de protones necesario. En la levadura, esta función se cumple por las ATPasas de la membrana plasmática y la vacuola.

La H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática, codificada por el gen *PMA1*, es el responsable del gradiente de pH de la membrana plasmática de la célula (Ambesi *et al.*, 2000). Es la proteína más abundante de la membrana plasmática, muy estable y consume al menos el 20% del ATP celular. Su actividad crea el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática, el cual es indispensable para todos los simportadores y antiportadores. La actividad de Pma1 está estrechamente regulada a la actividad metabólica y a las condiciones fisiológicas de las células, por ejemplo, la glucosa externa es un poderoso estímulo que lleva a una rápida y fuerte activación (Serrano and Villalba, 1993). Su actividad también está regulada de manera positiva en respuesta a la disminución del pH intracelular o el aumento de la captación de potasio. *S. cerevisiae* codifica una segunda H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática, Pma2, que es idéntica al 89% a Pma1. Pma2 es capaz de exportar protones, aunque sus propiedades enzimáticas difieren de las de Pma1. Su expresión en condiciones estándar de crecimiento es mucho menor que la de Pma1, lo que explica su carácter no esencial y su escasa repercusión sobre la homeostasis de cationes.

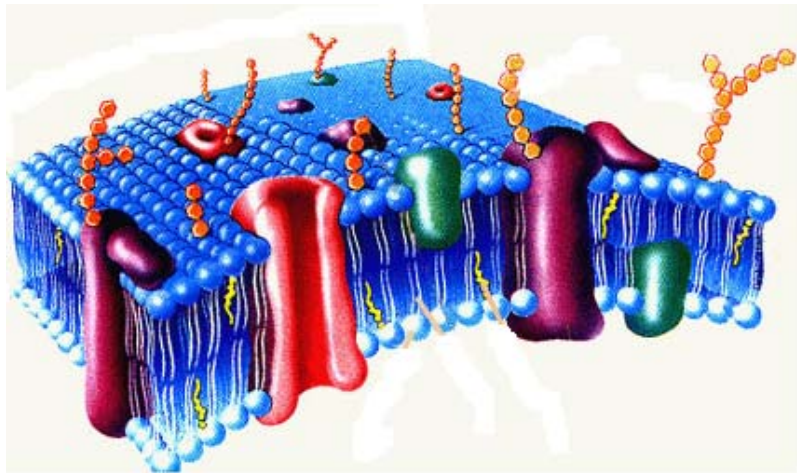
En contraste con la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática, la ATPasa vacuolar está formada por varias subunidades, tiene una compleja estructura que consiste en dos dominios principales, V1 periférico unido a la membrana V0. Cada uno de los dos dominios se compone de varias proteínas, y toda la estructura está relacionada con la ATP-sintasa mitocondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP (Kane, 2006). Esta ATPasa no sólo desempeña un papel crucial en la acidificación del lumen vacuolar, sino que también es indispensable para el buen funcionamiento de otros orgánulos. En las células de levadura, el análisis de la actividad de los orgánulos a lo largo de la vía secretora confirmó su importancia pero a la vez sugirió que esta ATPasa puede existir en orgánulos en distintas formas y bajo regulación selectiva. Es muy probable que su actividad genere el gradiente de protones a través de las membranas de los orgánulos que, a su vez, actúa como mediador en la función de los antiportadores de cationes de metales alcalinos de los orgánulos. La H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática muy probablemente colabora en el mantenimiento de la homeostasis del pH citosólico, y hay pruebas de que son



funcionalmente interdependientes y coordinadamente reguladas en múltiples niveles (Fig. 4) (Martínez-Muñoz and Kane, 2006).

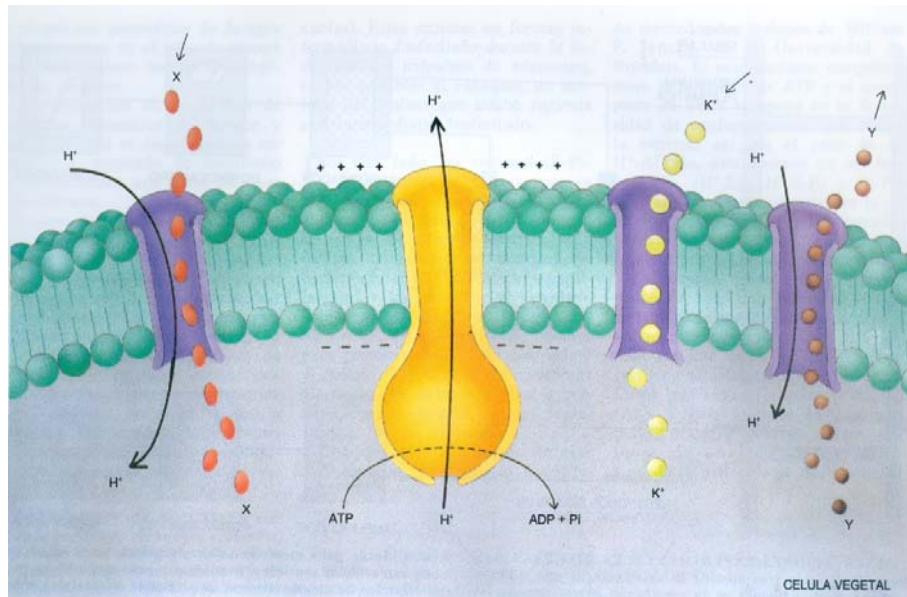
### 1.5 ATPasa. Función y regulación.

En plantas y hongos, la protón ATPasa es la principal responsable del gradiente electroquímico y por ende, de la homeostasis del pH y de cationes. El medio intracelular en estos organismos se caracteriza por altas concentraciones de iones potasio y magnesio y bajas concentraciones de iones sodio, cloro, hidrógeno y calcio. El medio externo, por el contrario, posee altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y bajas concentraciones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Serrano and Villalba, 1993).



**Figura 5.** Esquema general de la membrana plasmática de una célula eucariota. Está formada principalmente por una doble capa lipídica, proteínas transmembrana que actúan como canales para el transporte para la célula, proteínas globulares, glucolípidos y glicoproteínas (Serrano and Villalba, 1993).

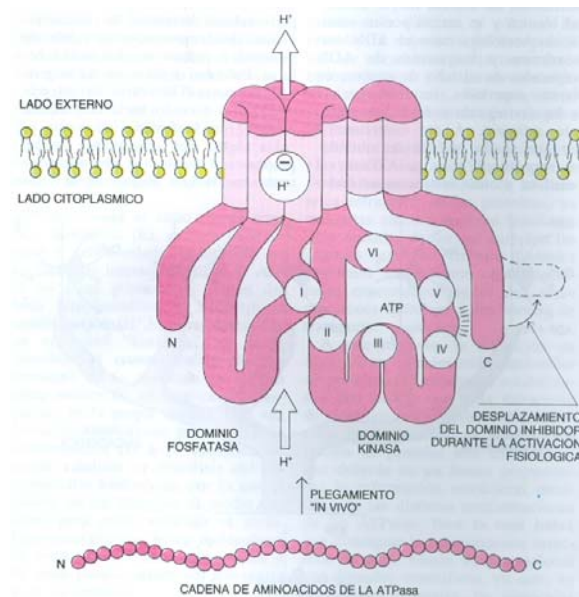
Evolutivamente la protón ATPasa surge debido a la presión selectiva creada por la necesidad de controlar el potencial osmótico y eléctrico dentro y fuera de la célula, ya que; la generación de ácidos por el metabolismo anaerobio de las células primitivas tendría a acidificar el medio interno celular. Por tanto, el desarrollo de una enzima capaz de expulsar protones ( $\text{H}^+$ ) suponía una ventaja evolutiva. Y eso ocurrió con la ATPasa, anclada en la membrana y capaz de expulsar protones a costa de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Esta bomba primitiva sería el origen de todas las demás ATPasas posteriores, capaces de transportar otros iones monovalentes o divalentes sodio, potasio y calcio (Sussman *et al.*, 1989).



**Figura 6.** Los circuitos quimiosmóticos de las células eucariotas divergen según hablemos de células vegetales o animales. En las vegetales, que es la que nosotros estudiamos, hay una ATPasa que bombea protones. Los transportes activos secundarios se encuentran acoplados a la entrada de protones (Serrano and Villalba, 1993).

Debido a la diferencia de potencial eléctrico, positivo en el exterior y negativo en el interior se produce la entrada de protones ( $H^+$ ) a la célula a través de unos canales proteicos abiertos en la bicapa lipídica, esto provoca un aumento de potencial en el interior celular que debe ser restablecido de alguna forma para no dañar a la célula, es aquí donde interviene la bomba de protones que utilizando energía en forma de ATP saca al medio extracelular  $H^+$  (Briskin, 1990).

Aquí los transportes activos secundarios se encuentran acoplados a la entrada de protones, ya que durante este transporte se produce la entrada de  $K^+$  y azúcares, aminoácidos, purinas... y la salida de calcio, succinato, lactato... a través de estos canales proteicos.



**Figura 7.** Modelo estructural de la ATPasa de protones (Serrano and Villalba, 1993).

### Modelo estructural de la ATPasa de protones.

La cadena lineal de la protón ATPasa está compuesta por 920-950 aminoácidos que se pliega en la membrana celular y configura una estructura muy compleja. El modelo destaca los dominios funcionales (fosfatasa, quinasa, inhibidor y transmembrana) y motivos de aminoácidos esenciales (I a VI) que han persistido a lo largo de la evolución.

El dominio inhibidor es el extremo carboxílico, que bloquea de forma regulable el centro activo. El dominio quinasa cataliza la formación del intermediario fosforilado; al dominio fosfatasa le corresponde catalizar la hidrólisis de dicho intermediario (Fig. 7).

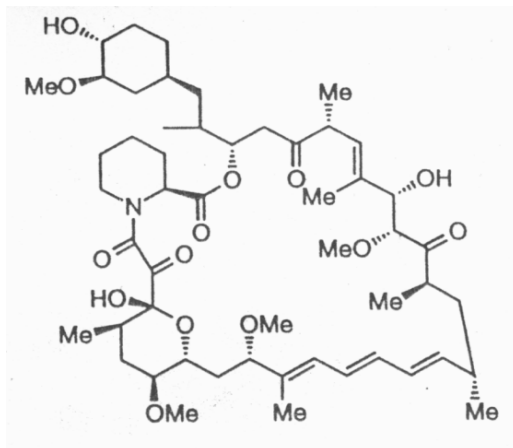
La actividad ATPasa es responsable no solo del mantenimiento del gradiente electroquímico sino que se ha demostrado que correlaciona con el pH intracelular, el transporte de aminoácidos, y lo que es más relevante para los objetivos del presente proyecto, con el crecimiento celular (Serrano and Villalba, 1993). A nivel molecular no tenemos ninguna pista de como la actividad de la protón ATPasa es capaz de regular el crecimiento celular. Toda la información disponible sobre regulación del crecimiento en función de la disponibilidad de nutrientes o del estado energético de la célula se relaciona con la ruta de señalización dependiente de la proteína TOR.

## 1.6 Ruta TOR

TOR (Target of Rapamycin, es decir, la diana de la rapamicina) es una proteína quinasa que constituye el nodo central de la altamente conservada señalización que regula el crecimiento celular en respuesta a nutrientes, hormonas y estrés en eucariotas.

La rapamicina o Sirolimus es un antimicótico descubierto en la isla de Pascua en 1970 como un agente antifúngico efectivo contra *Candida albicans*. En la década de los 90 también se descubrió sus propiedades como inmunosupresor efectivo en la terapia post trasplante (Vézina *et al.*, 1975).

Tiempo después, el medicamento mostró eficacia para combatir algunos cánceres, al frenar la proliferación celular y el crecimiento de los tumores. Su aplicación clínica como anticancerígeno se encuentra en fase de estudio. También se utiliza para recubrir dispositivos de uso intracoronario y prevenir la restenosis después de una angioplastia (Pritchard, 2005).



**Figura 8.** Molécula de rapamicina.

Mutantes de levadura resistentes a Rapamicina:

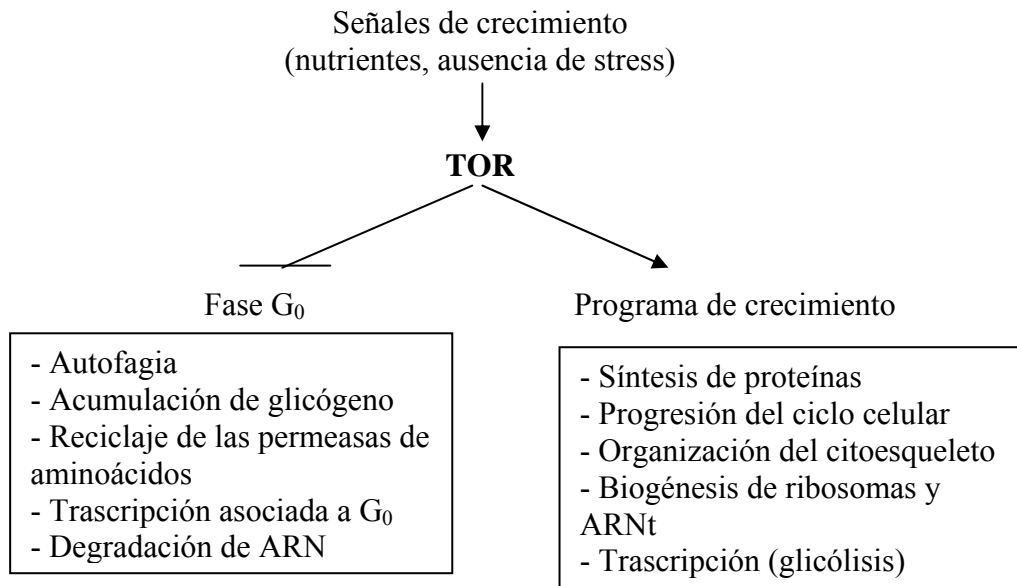
*fpr1* (recesivo, FKBP)  
*TOR1* (dominante)  
*TOR2* (dominante)

TOR es un miembro de la familia PIKK, una familia de serina/treonina quinasa, que incluyen DNA-PK, ATM y TEL1. Forma parte de dos complejos llamados TORC 1 y TORC 2. Estos son reguladores esenciales del crecimiento celular en respuesta a nutrientes, hormonas y estrés (Wullschleger *et al.*, 2006).

TORC 1 media el control temporal del crecimiento celular por activación de procesos anabólicos como la biogénesis ribosomal, síntesis proteica, transcripción, y la absorción de nutrientes; y bloquear procesos catabólicos inhibitorios como la autofagia y la proteólisis dependiente de ubiquitinación.

Por el contrario, TORC2 media el control espacial del crecimiento celular mediante la regulación del citoesqueleto (Wullschleger *et al.*, 2006).

## TOR: fundamental en la regulación del crecimiento celular



### **Complejos TOR: composición, estructura y localización.**

Los complejos TOR fueron originariamente descritos en *S. cerevisiae*, pero ahora también han sido identificados en una gran variedad de organismos, desde otras levaduras hasta mamíferos.

**Table 1**

Listed are the protein components of *S. cerevisiae* TORC1 and TORC2 and known homologs in other invertebrates (and mammals) in which TOR has been at least partly characterized. PRR5 has been suggested to be a weak homolog of BIT61 [6\*]. TOR has also been characterized in *Apis mellifera* and *Zea mays L* but no other TORC components have been studied so far in these organisms. – = no homolog found or the homologs are not known to be part of the complex

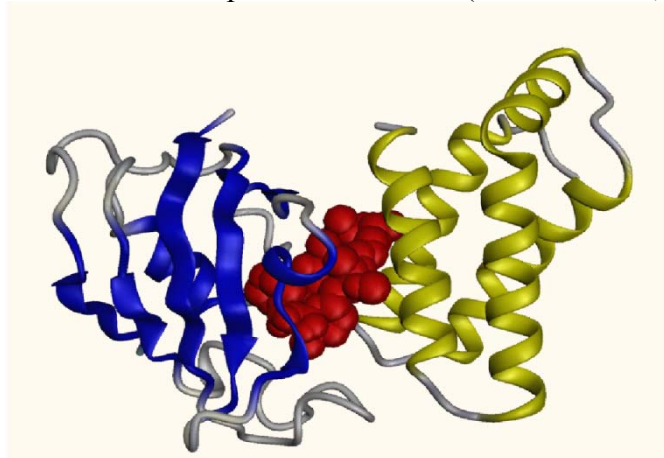
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. albicans</i>	<i>D. discoideum</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>T. brucei</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Mammals
<b>TORC1</b>									
TOR1 or TOR2	TOR1 or TOR2	TOR1	TOR	TOR	TOR1	TOR	TOR	TOR	mTOR
KOG1	MIP1	–	–	–	RAPTOR	Raptor1A Raptor1B	DAF15	RAPTOR	RAPTOR
LST8	WAT1	–	–	LST8	–	–	LST8	LST8	mLST8
TCO89	TCO89	TCO89	–	–	–	–	–	–	–
–	TOC1	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	PRAS40
<b>TORC2</b>									
TOR2	TOR1 or TOR2	TOR1	TOR	TOR	TOR2	TOR	TOR	TOR	mTOR
AVO1	SIN1	–	PiaA	–	–	–	SINH1	SIN1	mSIN1
AVO2	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AVO3	STE20	–	RIP3	–	AVO3	–	RICT1	RICTOR	RICTOR
LST8	WAT1	–	LST8	LST8	–	–	LST8	LST8	mLST8
BIT61	BIT61	–	–	–	–	–	–	–	PRR5/PRR5L

**Tabla 2.** Listado de los componentes proteicos que forman los complejos TORC1 y 2 en diferentes especies (Wullschlegler *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae*, TORC1 está formado por TOR (TOR1 o TOR2), KOG1 y LST8, mientras que TORC2 lo componen TOR2, AVO1, AVO3 y LST8. Además de los componentes principales, ambos complejos contienen subunidades específicas de cada especie (Soulard *et al.*, 2009).

Durante los últimos años TORC1 y TORC2 han sido identificados bioquímicamente y genéticamente en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, en el patógeno *C. albicans*, en la alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* y en el protozoo *Trypanosoma brucei*, en los cuales se observa el alto grado de conservación de estos complejos (Matsuo *et al.*, 2007 y Hayashi *et al.*, 2007).

TORC1 fue caracterizada por ser inhibida por rapamicina, mientras que TORC2 es insensible. Esto es debido a la capacidad del complejo rapamicina con la proteína FKBP a unirse directamente a TORC1 pero no a TORC2 (Loewith *et al.*, 2002).



**Figura 9.** FKBP-rapamicina-TOR (Dominio de unión a rapamicina). La estructura de FPR1, y no la de TOR, determina la sensibilidad a rapamicina de diferentes organismos.

En *Arabidopsis thaliana*, TORC1 es insensible a rapamicina debido a que la proteína homóloga a FKBP es incapaz de unir rapamicina. En *T. brucei*, TORC1 no está afectada por la rapamicina, mientras que el complejo TOR2 sí que lo está. En este caso, el complejo rapamicina-FKBP12 puede unirse solo a TOR2 libre pero no cuando está ensamblado con TORC2 sugiriendo que en este organismo, la rapamicina afecta al ensamblaje pero no a la estabilidad del complejo (Barquilla *et al.*, 2008). Finalmente en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* contiene los dos genes TOR, y ambos parecen ser sensibles a la rapamicina aunque no en todas las condiciones (Matsuo *et al.*, 2007 y Hayashi *et al.*, 2007; Otsubo and Yamamoto., 2008).

### **Localización de los complejos TORC1 y TORC2.**

La localización intracelular de TOR y sus complejos ha sido debatida muchos años. En *S. cerevisiae* han sugerido que TORC1 se encuentra en la periferia de la membrana plasmática, en los endosomas, en la membrana vacuolar o en el núcleo. Los dos complejos fueron encontrados en un fraccionamiento de las membranas de los endosomas. Además gracias a versiones de TOR que expresan la proteína GFP en la zona central de la proteína, se ha mostrado que TORC1 está en la membrana de la

vacuola mientras que TORC2 se ha localizado en el citoplasma y en algunos lugares de la membrana plasmática (Sturgill *et al.*, 2008).

	<i>S. Cerevisiae</i>	<i>S. Pombe</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TORC1</b>	Membrana vacuolar	Citoplasma	Retículo endoplasmático Membrana Plasmática	Núcleo
<b>TORC2</b>	Citoplasma Membrana plasmática	-----	-----	Retículo endoplasmático Mitocondria

### Complejo TORC1

TORC1 es la clave central de la mediación del control temporal del crecimiento celular, por su sensibilidad a una enorme variedad de factores de crecimiento como nutrientes, especialmente fuentes de nitrógeno y disponibilidad de aminoácidos, hormonas de crecimiento (insulina/IGF), energía celular (ATP), niveles de oxígeno y estreses. En organismos multicelulares, la cascada de señalización de regulación de TORC1 mejor caracterizada es la protagonizada por insulina-PI3K-TSC-Rheb (Wullschleger *et al.*, 2006). En esta ruta la insulina-PI3K inhibe la actividad de la proteína GTPasa (GAP) del complejo TSC (un complejo heterogéneo formado por dos proteínas TSC1 y TSC2), permitiendo que la pequeña GTPasa Rheb active TORC1. Mientras la señalización TSC-Rheb-TORC1 no está conservada en *S. cerevisiae* (no hay homólogos TSC), esta ruta sí que se encuentra en las levadura de fisión *S. pombe* y el hongo patógeno filamentoso *C. albicans* (Matsuo *et al.*, 2007, Hayashi *et al.*, 2007), indicando que esta ruta apareció pronto en la evolución.

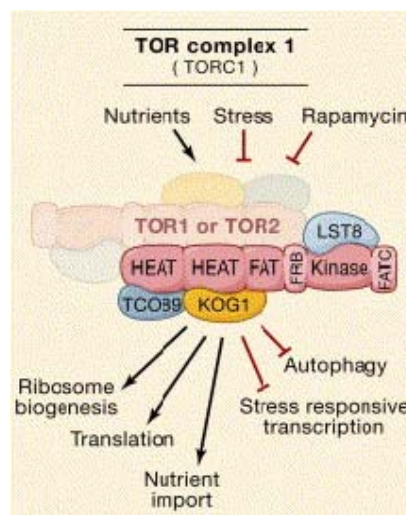
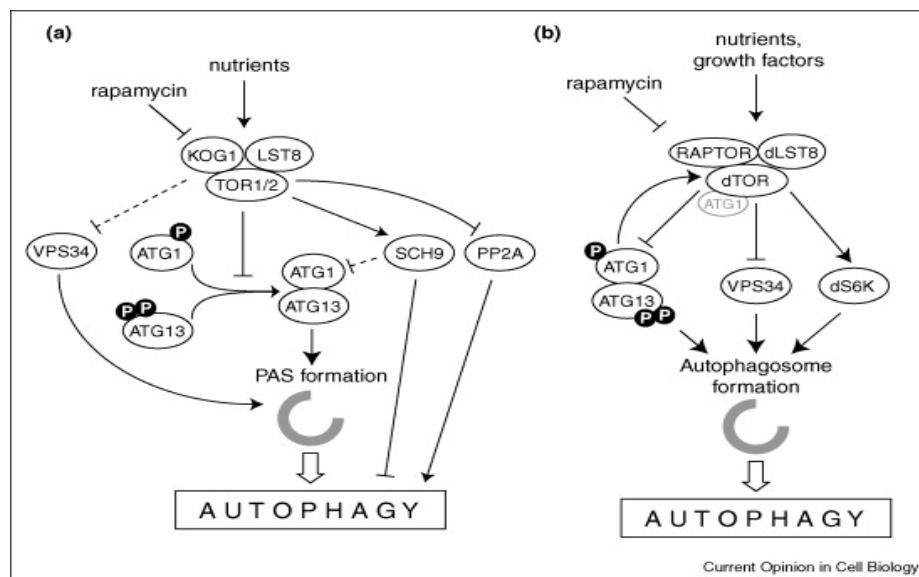


Figura 10. Estructura del complejo TOR1.

## TORC1 y la autofagia



**Figura 11.** El estudio de la autofagia se ha revelado como un mecanismo conservado. Regulación de la autofagia por TORC1 en: (a) *S. cerevisiae* y (b) *D. melanogaster* (Soulard *et al.*, 2009).

En respuesta a los nutrientes, TORC1 (TOR1/TOR2 / Dtor, KOG1/RAPTOR y LST8/dLST8) inhibe la autofagia, un proceso de degradación de la mayor parte de las proteínas y orgánulos de la vacuola / lisosoma. La autofagia es mediada por un número de proteínas conservadas llamadas ATG, cada una de ellas actúa en un paso específico en este proceso. TORC1 regula negativamente la autofagia en la levadura y en las moscas (Diaz-Troya *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae* (Fig. 11), TORC1 inhibe la hiperfosforilación de la quinasa ATG1 y ATG13. Al inhibirse TORC1, debido a la limitación de nutrientes o tratamiento con rapamicina, ATG1 y ATG13 son desfosforilados y asociados. Esto lleva a la formación de la estructura preautofagosomal (PAS), un paso esencial para la autofagia. La proteína quinasa SCH9, un objetivo directo de TORC1 inhibe la autofagia mientras que cuando la proteína PP2A es inhibida por TOR, ésta la activa. También parece estar implicado en la formación de PAS VPS34, éste favorece su formación al ser inhibido por el complejo TORC1.

A diferencia de la levadura, en *D. melanogaster* (Fig. 11b), la interacción de ATG1 y ATG13 no se altera por la inhibición de TORC1. ATG1 interactúa directamente con dTor y, una vez activado, las señales viajan de nuevo a TORC1 en una retroalimentación positiva, ciclo reforzador de la autofagia. VPS34 se requiere para la etapa temprana de la formación del autofagosoma. El AGC quinasa S6K es necesaria para la inducción normal de autofagia (Bishop and Guarente, 2007).



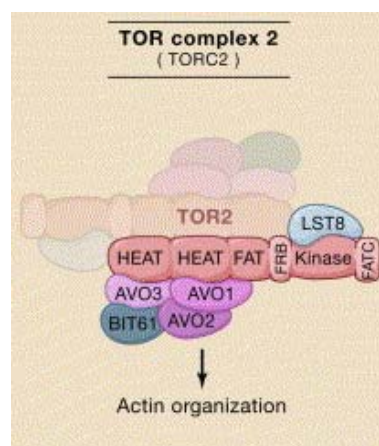
### TORC1 y la biogénesis de ribosomas

Una de las principales funciones de TORC1 en la promoción del crecimiento celular es la regulación positiva de la biogénesis de los ribosomas y su función (Wullschleger *et al.*, 2006, Cook and Tyers, 2007). En la levadura, TORC1 regula la expresión de los genes de las proteínas ribosomales (RP) y los genes de la biogénesis ribosomal (RIBI) a través de SCH9 (Urban *et al.*, 2007) y mediante el control de dos factores de transcripción, FHL1 y SFP1 (Wullschleger *et al.*, 2006, Cook and Tyers, 2007).

Recientemente se ha demostrado en la levadura que TORC1 se une y fosforila a SFP1 directamente, sensible a rapamicina, y que ésta fosforilación de TORC1 es esencial para mantener SFP1 en el núcleo donde puede activar la expresión de los genes RP y Ribi (Lempiainen *et al.*, 2009). Todo esto hace suponer que SFP1 es un homólogo funcional del proto-oncogén c-MYC que regula la transcripción de genes RP y Ribi en mamíferos. TORC1 regula también otros factores involucrados en la expresión del gen RP o la biogénesis de los ribosomas. En levadura, TORC1 regula la localización subcelular del factor DIM2 40S de la biogénesis del ribosoma, y la función de HMO1 en la regulación de ARNr y la expresión de los genes RP. En *Drosophila*, TORC1 controla la RNA pol I dependiente del factor de transcripción TIF-IA en la regulación de la síntesis del ARNr (Mayer *et al.*, 2004).

### Complejo TORC2

La proteína TOR también participa en el complejo TORC2. A diferencia de TORC1, sólo contiene TOR2 y también Avo1, Avo2, Avo3, Lst8 y Bit61 (Loewith *et al.*, 2002, Reinke *et al.*, 2004). La subunidad catalítica de calcineurina CNA1 puede formar parte de TORC2 en condiciones de ausencia de estrés (Mulet *et al.*, 2006). Avo1, Avo3 y Lst8 son proteínas conservadas y esenciales, necesarias para la actividad quinasa. Por el contrario Avo2 y Bit61 no son esenciales y no hay homólogos identificados en otros eucariotas, aunque la proteína PRR5 de mamíferos guarda cierta similitud con Bit61 y forma parte del complejo TORC2m (Hayashi *et al.*, 2007, Woo *et al.*, 2007). Estudios de la organización molecular del complejo revelaron que se encuentra en las levaduras en forma de dímero (Wullschleger *et al.*, 2005).

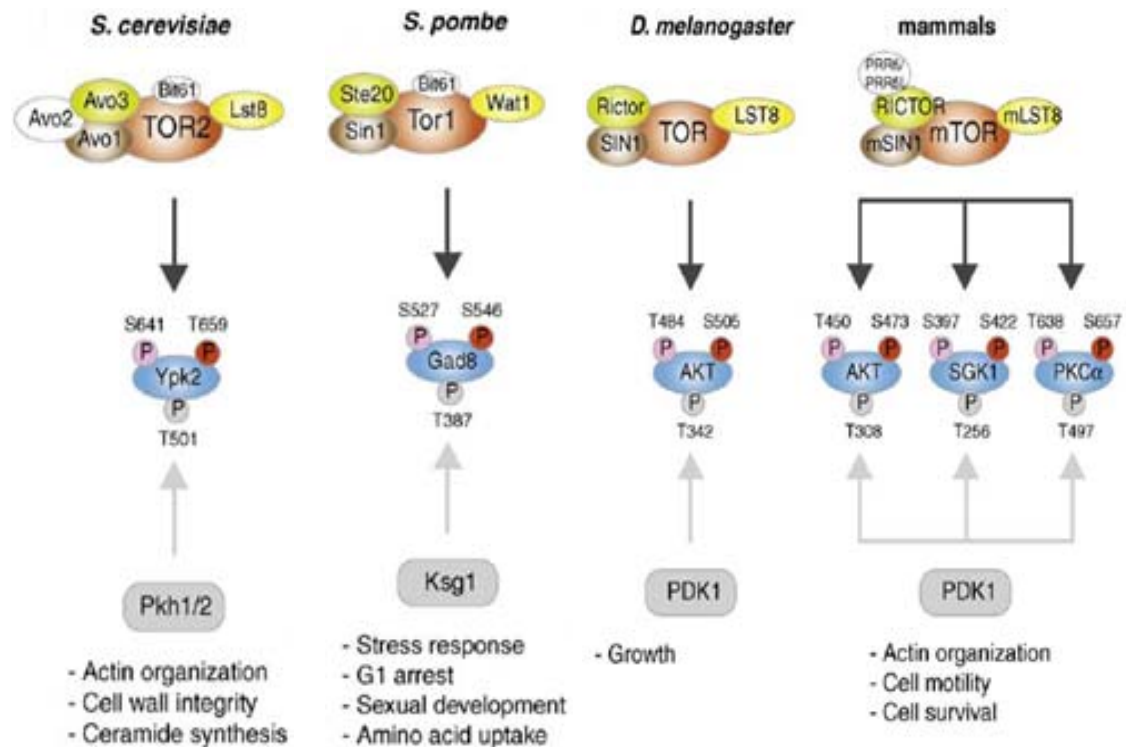


**Figura 12.** Estructura del complejo TOR2.

Incluso antes de conocerse los dos complejos en los que participa TOR, TOR2 era conocido por regular en la célula la polarización de la actina del citoesqueleto, implicándolo así en el control espacial del crecimiento de las células de levadura. Otros estudios mostraron que la despolarización aberrante de la actina del citoesqueleto en TORC2 en mutantes sensibles a temperatura puede ser suprimida por la hiperactivación de la vía de integridad de la pared celular, que implica a la proteína quinasa C1 (Pkc1). Varios estudios genéticos revelaron que Pkc1, a través de Rho-GTPasas como Rho1 y Rho2 y su PIB / GTP, media en TORC2 la señalización de la organización de la actina (Bickle *et al.*, 1998).

En 2005 se identificó el primer sustrato para TORC2 de levadura, la proteína quinasa 2 (Ypk2) (Kamada *et al.*, 2005). Ésta es una AGC quinasa estrechamente relacionada con el suero mamífero y glucocorticoides inducidos por la proteína quinasa 1 (SGK1). TORC2 activa Ypk2 directamente por la fosforilación de Ser641 y Thr659. La actividad de TORC2 también es necesaria para la fosforilación del motivo Pck1, aunque no está claro si lo fosforila directamente. Recientemente se ha visto que proteínas Slm, las cuales se unen a fosfatidilinositol-4 ,5-difosfato (PIP2), han sido caracterizadas como sustratos directos de TORC2. Slm1 y Slm2 pueden regular la organización de la actina independientemente de Ypk2. Sin embargo, un mutante constitutivamente activo de Ypk2 suprime la letalidad provocada por la pérdida completa de TORC2 (Kamada *et al.*, 2005), lo que sugiere que Ypk2 es el principal efector de TORC2.

Aronova *et al.*, han descrito recientemente más funciones sobre TORC2. A través de Ypk2 controla la ruta de biosíntesis de esfingolípidos y por lo tanto media la síntesis de novo de la ceramida (molécula base de los esfingolípidos que componen la bicapa lipídica de la membrana plasmática). También está involucrado en la regulación de la formación de los endosomas, estos son complejos que participan en los primeros pasos de la endocitosis. Esto quedó confirmado con la localización de la GFP-TOR2 en estructuras puntiformes en la proximidad de la membrana plasmática, que se asemejan a endosomas tempranos (Sturgill *et al.*, 2008).



**Figura 13.** Vía conservada del complejo TOR2 en diferentes organismos.

En todos ellos TORC2 está compuesto por la quinasa TOR (naranja), Lst8 (amarillo), Avo3 o su homólogo (verde) y Avo1 o su homólogo (marrón). En *S. cerevisiae*, *S. pombe* y en mamíferos componentes adicionales han sido identificados (blanco).

Todos los sustratos de TORC2 (azul) son miembros de la familia de AGC quinasas. Las AGC quinasas presentan un modo conservado de regulación de la fosforilación de sus motivos hidrofóbicos (rojo), “turn motif” (rosa) y la activación de los bucles (gris). TORC2 fosforila los motivos hidrofóbicos de todas las quinasas. Se ha visto que fosforila los “turn motif”, de forma directa o indirecta en Ypk2, Gad8, y AKT de mamíferos y PKC $\alpha$ . PDK1 (gris), que también se conserva en todos los organismos, fosforila la activación de los bucles (Cybulski and Hall, 2009).

En este trabajo nos proponemos estudiar a nivel molecular la relación de la ruta TOR con la regulación de la protón ATPasa de la membrana plasmática en levadura. Partimos de las observaciones preliminares que la ATPasa se activa por glucosa, y por lo tanto, depende del estado energético de la célula, igual que la ruta TOR. Además la actividad ATPasa correlaciona con el crecimiento celular, lo que indica que probablemente la protón ATPasa esté regulada por TOR, al ser esta ruta la principal responsable de controlar los procesos relacionados con el crecimiento. Otras evidencias indirectas que apuntan hacia esta interrelación serían que el transporte de aminoácidos depende del potencial de membrana, y a la vez es regulado por TOR.

## OBJETIVOS

## Objetivos

En el presente trabajo vamos a estudiar a nivel molecular la regulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa por parte de la ruta TOR, fijándonos tres objetivos:

1. Estudio de la expresión del gen PMA1 en diferentes mutantes de la ruta TOR.
2. Cantidad de proteína Pma1 en membrana en diferentes mutantes de la ruta TOR.
3. Actividad de la protón ATPasa en diferentes mutantes de la ruta TOR.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Materiales y métodos

### 3.1 Cepas de levadura

Las cepas de levadura utilizadas se describen en la siguiente tabla.

Cepa	Genotipo	Referencia
JM220	Sc TB50a	(MH1001) (JK9-3da <i>HIS4 his3</i> ) <i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+</i> , <i>HMLa</i>
JM726	Sc JK9-3a	SH100 (MH796) <i>tor2::ADE2-3 / YCplac111::TOR2</i> (CEDN, LEU2)
JM727	Sc JK9-3a	SH121 (MH753) <i>tor2::ADE2-3 / YCplac111::tor2-21ts</i> (CEDN, LEU2)
JM728	Sc TB50a	SH221 (MH754) <i>tor1::HIS3-3 tor2::ADE2-3 / YCplac111::tor2-21ts</i> (CEDN, LEU2)

**Tabla 3.** Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo (Helliwell *et al.*, 1998).

### 3.2 Medios y condiciones de cultivo

Los medios para el crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio se describen a continuación.

Medio completo (YPD): Se compone de extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v). Las placas de medio sólido contienen además 1.5% (p/v) de agar bacteriológico.

Medio mínimo SD: Se compone de 100 ml/l de glucosa 20%, 100 ml/l Yeast Nitrogen Base (YNB), 0.5M (5.9%) de ácido succínico a pH 3.5-5-5. Este medio puede ir suplementado por aminoácidos, 10 ml/l de adenina.

Las condiciones de cultivo seguidas para el crecimiento de las levaduras son las siguientes:

Realizamos un preinóculo en YPD a partir de colonias crecidas en medio sólido. Este preinóculo se incubaba durante 24 horas en un agitador rotatorio a 28 °C hasta una absorbancia a 660 nm entre 1 y 1.5. A partir de este inóculo preparábamos los cultivos a los cuales se les aplicaba el tratamiento de calor o rapamicina explicado en cada caso. A partir de estos cultivos cogíamos alícuotas a los tiempos indicados.

### 3.3 Extracción de ARN y análisis Northern

Seguimos el protocolo de extracción rápida de ARN descrito “*Analytical Biochemistry*. Vol. 384 (2009) 189-190”. En breve: partimos de cultivos a una OD entre 0,5-1. Obtenemos alícuotas de 2,5 unidades de OD que corresponde aproximadamente a  $7.5 \times 10^7$  células. Centrifugamos el cultivo 5 minutos a 3.000 rpm, eliminamos el sobrenadante y resuspendemos con 400  $\mu$ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y lo pasamos a un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Centrifugamos 2 minutos a 12.000 rpm y eliminamos el sobrenadante. Resuspendemos con 400  $\mu$ l de buffer de extracción de ARN (10mM ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 50mM tris (hidroximetil) aminometano (Tris)-HCl (pH 6) y 5% dodecil sulfato de sodio (SDS)) e incubamos 5 minutos a 65 °C. Tras esto, lo ponemos en hielo y añadimos 200  $\mu$ l de 0.3M KCl (pH 6), agitamos y centrifugamos 10 minutos a 12.000 rpm a una temperatura de 4°C. Recogemos el sobrenadante y añadimos igual volumen de solución fenol/cloroformo/isopropanol (25:24:1), agitamos y centrifugamos 5 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Nos quedamos con el sobrenadante y precipitamos con 0.1 volumen de acetato de sodio (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol. Incubamos 10 minutos a -20°C y centrifugamos otros 10 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Para acabar, lavamos con 1 ml de una solución de etanol 70% + agua DEPC, secamos con la bomba de vacío, añadimos 30  $\mu$ l de agua DEPC. La concentración final la determinamos por métodos espectrofotométricos utilizando un aparato del tipo nanodrop. Las muestras se almacenan a -80 °C hasta el análisis northern.

NORTHERN (Métodos de bioquímica y biología molecular. Serrano, 1993)

Separamos el ARN en función de su peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa con formaldehído.

Electroforesis.

Limpiamos previamente la cuvette y el tanque de electroforesis con SDS 1% para asegurar que estén libres de ARNasas y enjuagar con agua DEPC (dilución 1/1000 de dietilpirocarbonato) (o agua Milli Q).

Para preparar el gel: Mezclamos 1 gr de agarosa, 10 ml de MAE 10X (0.2M de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), 50mM acetato sódico, 10mM EDTA a pH 7) y 84 ml de agua tratada con DEPC. Disolvemos la agarosa al calor y esperamos a que se enfríe a 50-55 °C. En adelante trabajamos en campana de gases para evitar los vapores del formaldehído. Añadimos 6 ml de formaldehído (37%, 12.3M; se queda en 2.2% final), mezclamos y vertemos la solución en la cubeta para que se solidifique.

Ponemos en el tanque de electroforesis tampón de muestra (electroforesis) 1.25X (100 ml MAE 10X, 30 ml formaldehído, 870 ml H<sub>2</sub>O).

Preparación de las muestras según la cantidad obtenida en el nanodrop.



Inoculamos según la cantidad obtenida en el nanodrop a razón de 15 µg de ARN por muestra de ARN (en el caso de patrones de peso molecular utilizar 3 - 6 µg totales, 0.5 - 1 µg de cada banda) con igual cantidad de tampón de carga LB 1.25X (200 µl LB 1.25X, 1µl de bromuro de etidio 1%). Calentamos la muestra 10 minutos a 56°C y centrifugamos 5 segundos. Aplicar la muestra al pocillo y correr el gel durante 3-4 horas a 50 V. Como patrón de peso molecular utilizamos el ARN ribosómico.

#### Montaje.

Una vez corrido el gel desnaturalizante hacemos una foto. El gel se coloca en una bandeja previamente bien limpiada con agua y jabón. El gel se lava con SSC 10X (0.15 citratotrisódico dihidratado, 1.5M NaCl, ajustado a pH 7 con HCl), dos veces de 15-30 minutos cada vez. Con esto se consigue quitar el formaldehído del gel.

Después se procede a la transferencia. Ésta consiste en pasar mediante capilaridad el ARN del gel hasta una membrana de nylon. El montaje es estándar, pero usando SSC 10X como tampón. Ponemos el gel y encima una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>) empapado con SSC 10X. Encima, tres hojas de papel Whatmann empapadas de la misma forma y papel absorbente para que absorba el líquido y de esta forma pasen las moléculas a la membrana. Ponemos cintas de Parafilm a los cuatro lados para evitar el circuito del líquido. La transferencia tiene una duración de 3-4 horas pero se puede dejar el tiempo que se quiera.

Acabada la transferencia secamos el filtro (se deja sobre papel Whatmann) y fijamos el ARN a la membrana induciendo la formación de enlaces covalentes mediante radiación ultravioleta. Comprobamos cómo ha ido la transferencia con UV pequeño a 260 nm. Marcamos las bandas ya que luego no serán visibles.

El filtro se guarda envuelto en plástico y bien protegido de la humedad.

#### Hibridación.

Preparamos la sonda radiactiva según el método de Feinberg y Vogelstein (oligolabelling) extraído del libro “Métodos de bioquímica y biología molecular. Serrano, 1993”. Este método se basa en la utilización de una mezcla al azar de hexanucleótidos que actúan como “primers” para la acción del fragmento Klenow de la ADN polimerasa. Resultan trozos de sonda de 200-800 pares de bases (pb).

#### Procedimiento.

Diluimos 40-80 ng del ARN a marcar con agua a un volumen final de 15 µl y calentar 10 minutos a 95°C para desnaturalizar. Ponemos en hielo. Añadimos 5 µl de OLB 5X (Hexanucleótidos al azar (Pharmacia, producidos por degradación del ADN pancreático del timo de un ternero, catálogo 27-2166-01) 0.2 mg/ml, Cl<sub>2</sub>Mg 25mM, Ditiotreitól 5mM, MES 0.1M a pH 6.8 con Tris, dATP, dGTP, dTTP 0.1mM), 2.5 µl albúmina de

suero bovino (BSA) 10X ((Pharmacia, número 27-8915-01) 1 mg/ml en agua (alfa-<sup>32</sup>P) dCTP (Amersham)), 2 µl (alfa-<sup>32</sup>P) dCTP (20 µCi totales) y 1 µl Klenow (2 U/µl).

Incubamos de 4-6 horas a temperatura ambiente. Comprobamos la incorporación mezclando 1 µl de la reacción con 5 µl de ARNt 1% (carrier) y 0.5 ml de tricloroacético al 15%. Incubamos 5 minutos en hielo y centrifugamos 10 minutos. Resuspendemos el sedimento con 0.5 ml NaOH 2M y comprobamos la radioactividad en el sobrenadante y el sedimento (Geiger).

Añadimos 25 µl de solución de parada 2X (EDTA 10mM (pH 8) y SDS 1%), calentamos 10 minutos a 95°C y guardamos congelado. Resulta 0.8-1-6 ng/µl, 0.4 µCi/µl.

Prehibridación: Colocamos el filtro en un tubo de hibridación y añadimos 5-10 ml de tampón de hibridación (0.4M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2, 1mM EDTA, 7% SDS). Incubamos a 65 °C durante 15-30 minutos. Transcurrido este tiempo quitamos la solución de hibridación si está coloreada (por el bromofenol) y procedemos a la hibridación.

Hibridación: En el tubo de la prehibridación ponemos 2 ml del tampón de hibridación y añadimos la sonda radiactiva previamente preparada, dejamos a 65 °C en agitación.

Una vez realizada la hibridación procedemos a los lavados.

2 lavados de 5 minutos con 20 ml de SSC 4X, 0.1% SDS.  
1 lavado de 5 minutos con 20 ml de SSC 0.4X, 0.1% SDS.

Revelado.

Una vez limpiado el filtro de la radioactividad sobrante, envolvemos en papel de film y lo situamos sobre una película fotográfica. Una máquina reveladora detectará la radioactividad transferida del filtro a la película y obtendremos el resultado de la expresión del ARN.

### **3.4 Extracción de proteínas y análisis Western.**

El protocolo de extracción de proteínas de un cultivo de levadura es similar al empleado en el análisis del ARN (Métodos de bioquímica y biología molecular. Serrano, 1993). Partiendo de un cultivo de células de levadura *S. cerevisiae* en fase exponencial cogemos 25 unidades de OD

Centrifugamos 5 minutos a 3.000 rpm y eliminamos el sobrenadante, resuspendemos en 1 ml de agua estéril y lo pasamos a tubos eppendorf de 1.5 ml. Tras esto, centrifugamos 2 minutos a 12.000 rpm y eliminamos el sobrenadante.

Una vez extraídas las células pasamos a su ruptura y extracción de sus proteínas. El protocolo utilizado se encuentra en el libro “Métodos de bioquímica y biología molecular” Serrano, 1993; el cual lo detallamos a continuación.

Resuspendemos con 500 µl de tampón de extracción (0.1M Tris 1M pH8, 0.01M EDTA 0.5M pH8, 0.06M KCl 3M; 1 Tableta de coctel de inhibidor de proteasas de ROCHE (cat nº 04 693 132 001), 1/500 volumen total de ditioneitol (DTT)) y pasamos a tubos de 15 ml. Añadimos bolas de vidrio frías 0.5 mm hasta el menisco y agitamos en vortex durante tres periodos de un minuto con intermedios de medio minuto en hielo. Tras esto diluimos con 1 ml de GTED20 (20% glicerol (volumen/volumen), 10mM Tris, 1mM EDTA, 1mM DTT a pH 7.6 con HCl) y centrifugamos en frío 10 minutos a 2.000 rpm, recogemos el sobrenadante. Centrifugamos en frío 20 minutos a 15.000 rpm, nos quedamos con el pellet (sedimento) y lo resuspendemos en 200 µl de GTED20.

Pasamos cada muestra por un triturador para crear una mezcla homogénea.

#### Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Es un método para la cuantificación de proteínas mediante colorimetría. Es el método más sencillo y sensible que hay, está basado en el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blue G). A pH ácido la unión del colorante a las proteínas determina el color azul, según la cantidad de proteína existente el color será más o menos intenso. Mediante un espectrofotómetro medimos dicha intensidad y mediante una curva patrón calculamos la cantidad de proteína existente en la muestra.

Diluimos la proteína a razón de 2 µl de muestra en 20 µl de agua. Diluimos la solución BSA 1/10 para formar la curva patrón. En una placa multipocillo añadimos de 0-10 µl de BSA y completamos hasta 10 µl de agua. Aplicamos las muestras: 1 µl de proteína en 9 µl de agua y añadimos el colorante comercial preparado BioRad 5X diluido para obtener 1X, 140 µl en cada muestra. Calculamos con el espectrofotómetro una absorbancia de 595 nm la intensidad de color y formamos la curva patrón para obtener la cantidad de proteína. Son necesarios para proseguir con el estudio 10 µg de proteína por muestra.

WESTERN (Métodos de bioquímica y biología molecular. Serrano, 1993)

Electroforesis.

El método elegido para separar las proteínas es una electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando el sistema de gel y pregel.

Gel inferior: Mezclamos 4.5 ml de tampón de resolución 2X (0.75M Tris, 0.2% SDS a pH 8.8 con HCl), 3.7 ml de agua, 1.8 ml de acrilamida al 8% y para formar la reacción de polimerización 60 µl de APS (persulfato amónico 10% (peso/volumen) en agua) y 6 µl de tetrametiletilenediamina (TEMED).

Lo introducimos entre los cristales y añadimos 700 µl de isopropanol para nivelar la interfase. Dejamos polimerizar.

Gel superior: Mezclamos 1.8 ml de “stacking buffer” (0.25M Tris, 0.2% SDS a pH 6.8 con HCl), 1.5 ml de agua, 300 µl de acrilamida 8%, 30 µl de APS y 3 µl de TEMED. Introducimos en el cristal y añadimos a los pocillos. Dejamos polimerizar.

Preparación de las muestras. Cargamos 30 µg de proteína la cual hemos calculado mediante el método Bradford. Añadimos la misma cantidad de tampón Laemly 5X. Añadimos 0.5 µl de inhibidor de proteasas 4-(2-Aminoetil) fluoruro de benzenosulfonil clorhídrico (AESBF), ya que la ATPasa puede degradarse, diluido 1/30. Calentamos 3 minutos a 37°C y ponemos en hielo.

Cargamos las muestras y añadimos 10 µl de un marcador de peso molecular (BenchMark Prestained). Añadimos el tampón de electroforesis 1X (10X: 144 gr glicina, 1% SDS a pH 8.3 con Tris) rellenando la cuvetta hasta la mitad. Aplicamos un voltaje de 100 V durante 15 minutos para que las muestras pasen el primer gel y después 45 minutos a 150 V.

Transferencia.

Usamos el tampón de transferencia Towbin (14.4 g/l glicina 0.19M, 25mM Tris, 20% metanol pH 8.3). Conectamos a la corriente y ajustamos a 100 V, dejamos de 90-120 minutos a 4°C.

Detección inmunológica.

Prehibridamos durante 30 minutos con una solución de saturación (15 ml TBS Tween 0.1%, 0.3 gr leche desnatada). Después, hibridamos con el anticuerpo primario (Anticuerpo 835 Anti-Pma1 diluido 1/5000) durante toda la noche, el cual reconocerá la proteína ATPasa y quedará unido a ella (Serrano, 1993).

Lavamos la membrana con el tampón TBS con 0.1% de Tween (150mM ClNa, 20mM Tris-ClH pH 7.6, 1/1000 (v/v) Tween 20). Realizamos 3 lavados de 10 minutos en agitación. Añadimos el anticuerpo secundario (Anticuerpo Anti-conejo diluido 1/5000) que reconocerá al primario y provocará una reacción química que producirá coloración y de esta forma podremos detectar la proteína. Incubamos 1 hora. Lavamos igual que antes.

El revelado consta de una reacción química producida por la fosfatasa alcalina. El anticuerpo secundario lleva una peroxidasa, ésta al reaccionar con la fosfatasa alcalina producirá la coloración de la proteína. Incubamos 3 minutos la membrana con el tampón de fosfatasa alcalina (0.1M Tris-ClH pH 9, 0.1M ClNa y 5mM Cl<sub>2</sub>Mg) y preparamos una solución de 10 ml de tampón de fosfatasa y 50 µl del reactivo NBT (nitroblue tetrazolium chloride, solución al 5% en 70% dimetilformamida, 30% agua) y lo añadimos a la membrana tras la incubación. Esperamos unos minutos a que se produzca la reacción y cuando ya se observe color paramos la reacción cubriendo la membrana con agua.

### 3.5 Análisis de la actividad enzimática.

El protocolo de extracción de proteínas de un cultivo de levadura es el mismo que en el caso del análisis western. Determinamos la concentración de proteína mediante el método Bradford, de esta forma preparamos los pocillos según la cantidad establecida.

Determinación de la actividad de la Pma1 ATPasa.

La actividad específica de la Pma1 ATPasa en las membranas crudas es del orden de 0.1 mU/ $\mu$ g. Para determinarla utilizaremos un micrométodo basado en el reactivo molibdato-ácido sulfúrico-ascorbato.

Preparamos por duplicado pocillos con 0, 3 y 6  $\mu$ g de proteína de membranas crudas (añadidas en menos de 10  $\mu$ l). Empezamos la reacción añadiendo 65  $\mu$ l de tampón de reacción (50mM MES-Tris pH5.7, 5 mM  $\text{NO}_3\text{K}$ , 5 mM azida, 0.3 mM molibdato y 2mM ATP) precalentado a 30°C e incubamos las placas a esta temperatura durante 20 minutos. Paramos la reacción con 130  $\mu$ l del reactivo del fosfato con ascórbico (2% ácido sulfúrico, 0.5% molibdato amónico, 0.5% SDS y 1/100 de volumen de ascórbico al 10%. Ascórbico 10%: 100 mg/ml agua), dejamos desarrollar color durante 5 minutos y leemos la absorbancia con un lector de microplacas con filtro de 690 nm.

Preparamos por duplicados pocillos con 0, 2 y 4  $\mu$ l de patrón de fosfato 5mM (5 $\mu$ l  $\text{PiNa}$  1M pH 7 en 1 ml de agua). Añadimos tampón de reacción como a las muestras e incubamos y procesamos igual. Los pocillos sin fosfato servirán para ajustar a cero el espectrofotómetro. Aunque el ATP lleva una pequeña cantidad de fosfato (del orden del 1%), la absorbancia correspondiente será ajustada a cero y descontada del fosfato generado por hidrólisis del ATP.

Cálculo de la actividad ATPasa.

Utilizando los patrones de fosfato construimos una curva patrón para convertir absorbancias en nmoles de  $\text{P}_i$  (la equivalencia suele ser del orden de 0.001 unidades de absorbancia por nmol de  $\text{P}_i$ ). Calculamos los nmoles de  $\text{P}_i$  producidos por las membranas. Dividimos por 20 minutos y por los  $\mu$ g de proteínas para obtener nmoles  $\text{P}_i$   $\times$   $\text{min}^{-1} \times \mu\text{g proteína}^{-1}$ . Esto es mU (miliunidades) /  $\mu$ g de proteína (suele ser del orden de 0.1 en membranas crudas).

## RESULTADOS

## Resultados

El siguiente trabajo vamos a estudiar la protón ATPasa Pma1 de levadura en diferentes cepas con mutaciones termosensibles de TOR1 o de TOR2 o tratadas con rapamicina. Este estudio lo realizaremos a tres niveles: a) expresión del gen (Northern), b) cantidad de proteína (Western), c) actividad de la proteína (ensayo de consumo de ATP). En todos los casos partimos de cultivos en fase de crecimiento exponencial. La protón ATPasa representa casi el 50% de la proteína de membranas plasmáticas purificadas a partir de células creciendo en fase exponencial. En fase estacionaria disminuye un 20-30% por lo que es más conveniente trabajar en cultivos exponenciales.

En todos los casos partimos de precultivos saturados en YPD que utilizamos para inocular YPD fresco, teniendo en cuenta de obtener una OD<sup>660</sup> entre 0.2 y 0.4 al inicio del experimento a la mañana siguiente. Normalmente para 100 ml de medio YPD inoculamos entre 15 – 20 µl de inóculo. Una vez inoculado se deja creciendo toda la noche en agitación. Cuando ya ha crecido y la OD es la adecuada se empieza la toma de muestras a diferentes tiempos, indicados en cada figura.

Las condiciones de cultivo a las que sometemos a las cepas de levadura son:

- Cepa TB50 con rapamicina (400 ng/ml) a temperatura ambiente.
- Cepa con el alelo termosensible de TOR1 a 37°C.
- Cepa con el alelo termosensible de TOR2 a 37°C.

Los controles para poder ver las diferencias en la expresión y cantidad de proteína son:

- Cepa TB50 a temperatura ambiente.
- Cepa TB50 a 37°C.
- Cepa termosensible TOR1 a temperatura ambiente.
- Cepa termosensible TOR2 a temperatura ambiente.

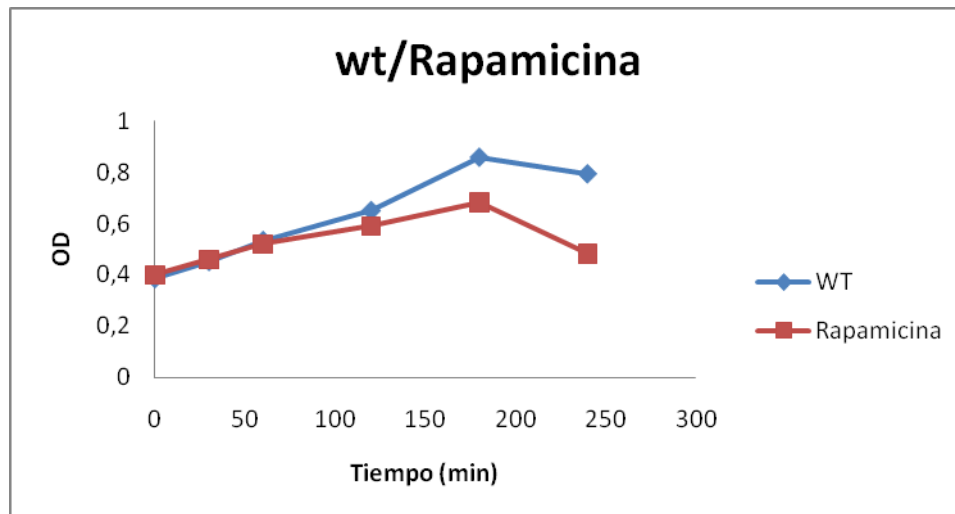
### 4.1 Análisis de la expresión de *PMA1* en mutantes de TOR

#### 4.1.1 Levaduras silvestres tratadas con rapamicina

Aquí se muestran los datos obtenidos en la extracción de las muestras de levadura a diferentes tiempos y en diferentes condiciones de cultivo. Tenemos un cultivo silvestre “wild type” (wt) que nos servirá de control y otro tratado rapamicina a una concentración de 400 ng/ml en el que esperamos una inhibición del crecimiento. Éste es el primer paso para el análisis de la expresión del gen *PMA1* de la ATPasa.

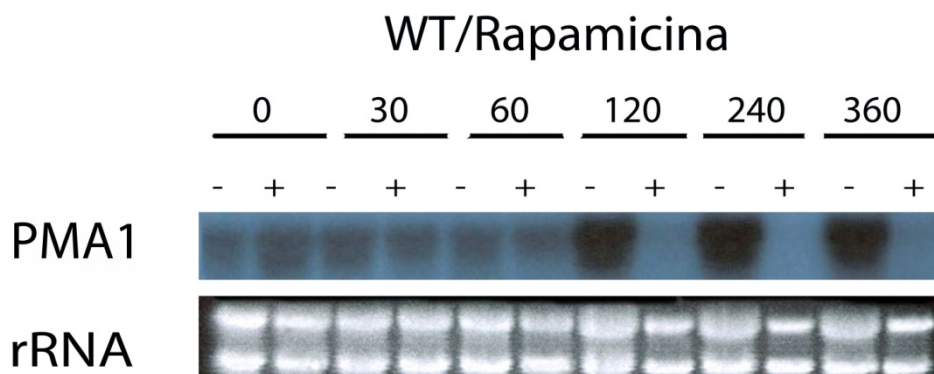
Como control del efecto de la rapamicina presentamos la curva de crecimiento (fig. 1) en la que se ve como a partir de las 2 horas la cepa tratada detiene su crecimiento. El

decaimiento en el último punto que se observa en el wt es debido a que añadimos YPD fresco para que el cultivo no alcanzara la saturación.



**Figura 14.** wt/Rapamicina. Gráfica que representa la variación de la OD del cultivo en condiciones normales y la OD sometida a la droga respecto al tiempo.

Para analizar la expresión de *PMA1* cargamos 15 µg de ARN de las muestras de los cultivos tomadas a diferentes tiempos. El resultado se puede ver en la figura 2.



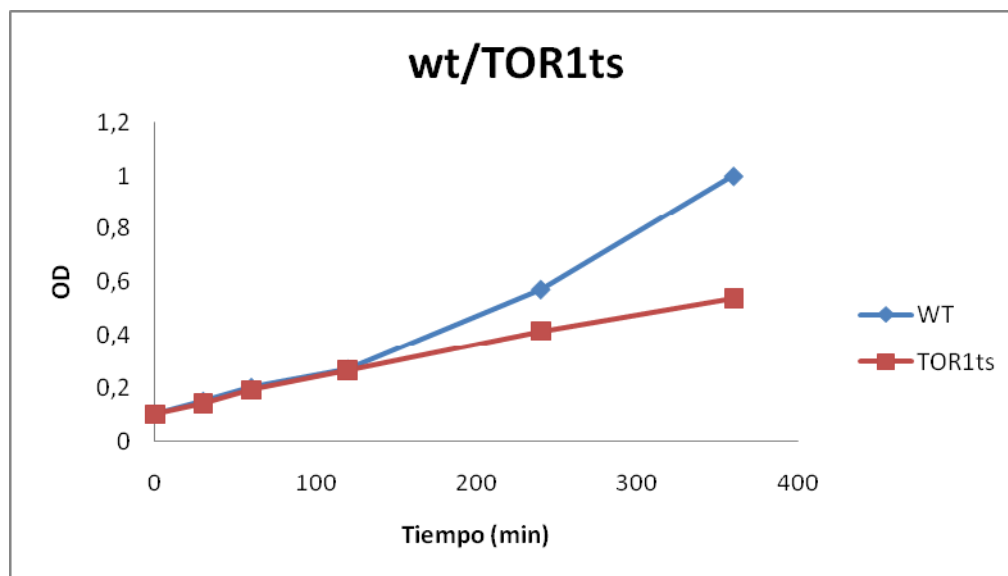
**Figura 15.** Northern wt/Rapamicina. Las muestras con el signo – representan al wt y las del signo + son las que han sido cultivadas con rapamicina. La parte superior muestra el resultado de la expresión del ARN de las muestras, la parte de abajo es el control de carga. Todo está en función del tiempo de extracción de las muestras representado por los números.

Observamos la diferente expresión entre el cultivo sin tratamiento y el cultivo tratado.



#### 4.1.2 Cepa con un alelo termosensible para TOR1

La cepa SH221 (Helliwell *et al.*, 1998) contienen una alelo termosensible para el gen *tor2*, pero que afecta a su función como parte del complejo TORC1, por lo que esta cepa se utiliza como mutante condicional de TOR1. Estudiamos la expresión del gen *PMA1* en estas condiciones para descartar que el efecto que veíamos sobre la expresión de *PMA1* no fuera debido a un efecto de la rapamicina, independiente de su acción como agente inhibidor de TORC1.

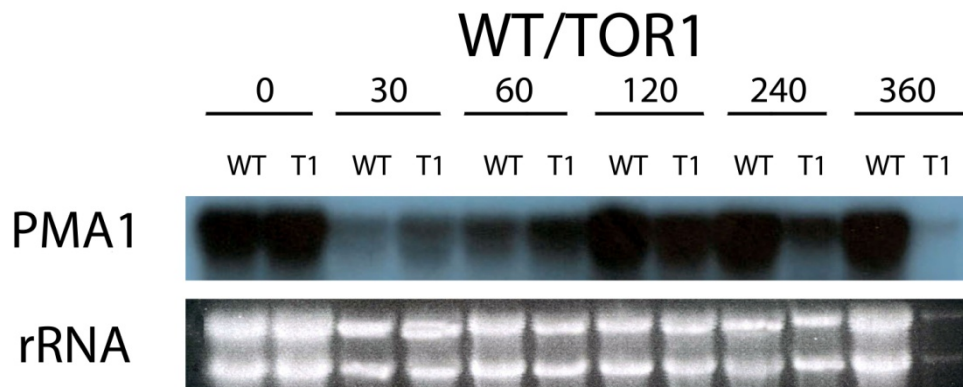


**Figura 16.** wt/TOR1<sup>ts</sup>. Gráfica que representa la variación de la OD del cultivo en condiciones normales y el cultivo termosensible respecto al tiempo.

Vemos como el termosensible no crece de la misma manera que el wt ya que presenta una inhibición en el crecimiento debido a que ha sido sometido a una elevada temperatura. Los primeros compases del crecimiento están igualados pero poco a poco la temperatura hace reducir el crecimiento de éste, que claramente se ve afectado por esta condición anormal.

Tras la toma de muestras, hemos determinado la cantidad de ARN con el nanodrop y cargamos 15 µg de ARN total.

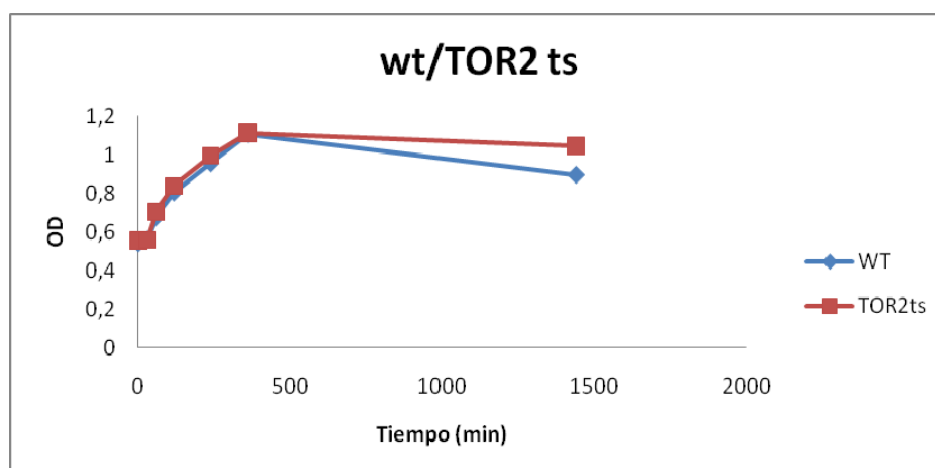
El análisis de la expresión ha determinado la siguiente figura.



**Figura 17.** Northern wt/TOR1<sup>ts</sup>. Resultado de la expresión del ARN de las muestras de levadura (arriba), control de carga de las muestras (abajo). Los números representan el tiempo con que están tomadas las muestras desde el inicio de la incubación. wt significa la cepa salvaje y T1 es la cepa termosensible.

#### 4.1.2 Cepa con un alelo termosensible para TOR2

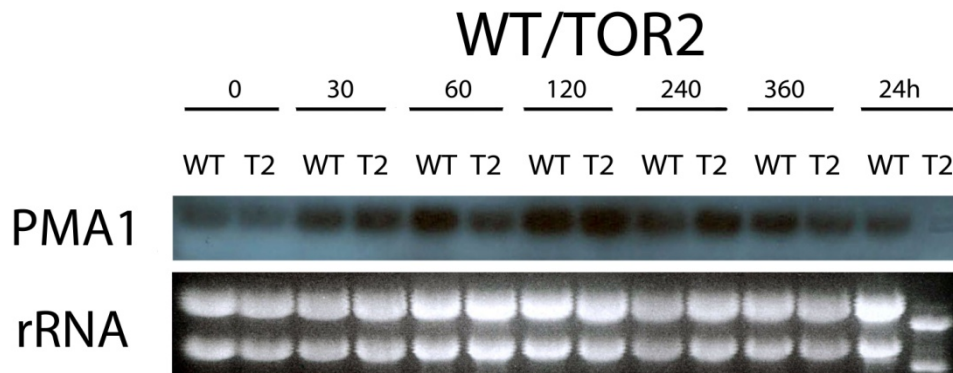
Como se ha explicado en la introducción la proteína TOR forma parte de dos complejos diferentes. El complejo TORC1 que regula la entrada en G<sub>0</sub> y controla multitud de funciones relacionadas con la acumulación de masa como la síntesis de ribosomas y el complejo TORC2, implicado en la polarización del citoesqueleto de actina (Loewith *et al.*, 2002). A priori no podemos descartar que la regulación de la protón ATPasa por la ruta TOR no dependa también de TORC2, máxime cuando se ha relacionado que esta ruta está implicada en la inhibición de ruta de estrés (Mulet *et al.*, 2006) y en biosíntesis de lípidos de membrana (Aronova *et al.*, 2008). El complejo TOR2 no se inhibe por rapamicina, pero disponemos de la cepa SH121 que tiene un alelo termosensible de tor2, el cual a temperatura restrictiva específicamente inhibe la acción de TORC2, pero mantiene la de TORC1.



**Figura 18.** wt/TOR2<sup>ts</sup>. Gráfica que representa la variación de la OD del cultivo en condiciones normales y el cultivo termosensible respecto al tiempo.

En TOR2<sup>ts</sup> la inhibición se observa de forma más tardía por lo que hemos alargado la toma de muestras hasta 24 horas para que se demostrara esta diferencia en el

crecimiento. Tras cargar 15  $\mu\text{g}$  de ARN total los resultados son los mostrados en la siguiente figura.

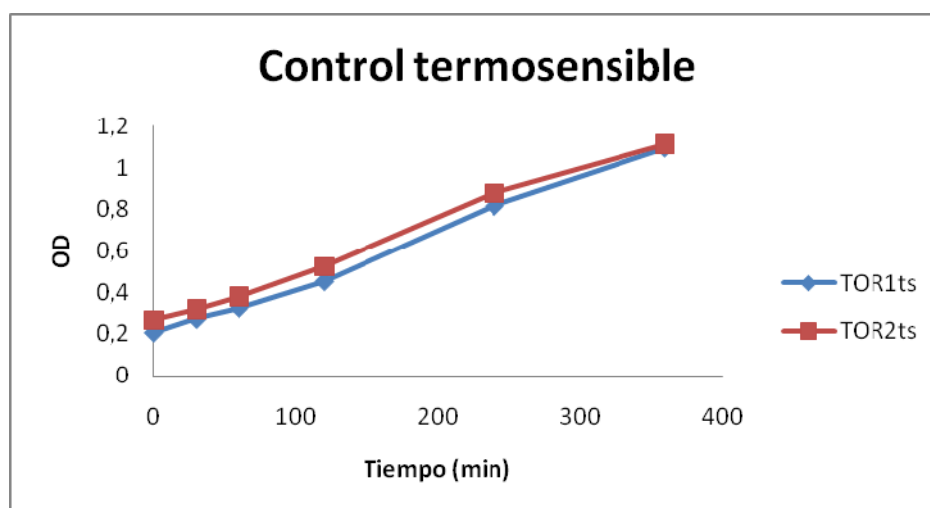


**Figura 19.** Northern wt/TOR2<sup>ts</sup>. Resultado de la expresión del ARN de las muestras de levadura (arriba), y el control de carga de las muestras (abajo). Queda reflejado el tiempo con que están tomadas las muestras desde el inicio de la incubación.

Aunque en menor medida que en los otros casos, pero también se observa una disminución en la expresión de *PMA1*, pero menor en la intensidad y a tiempos más largos en las muestras termosensibles de levadura.

#### Controles TOR1<sup>ts</sup>/TOR2<sup>ts</sup>

Para descartar cualquier efecto debido a los alelos termosensibles y que no fuera debido a la inhibición de los complejos en los que participa la proteína TORC a temperatura restrictiva observamos la expresión de *PMA1* a temperatura normal en las cepas termosensibles.

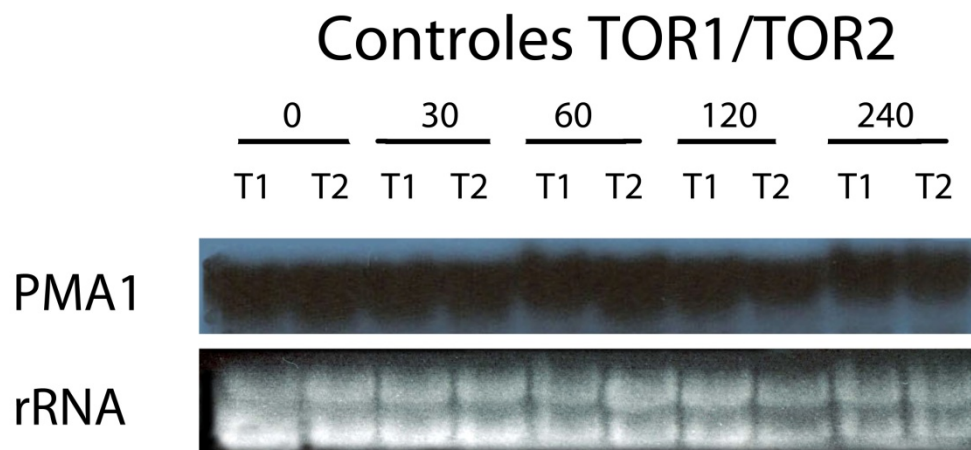


**Figura 20.** Controles. Gráfica que representa la variación de la OD del cultivo en condiciones normales de los termosensibles respecto al tiempo.

Como no hay inhibición ya que en condiciones normales estas cepas actúan como una cepa normal, es decir igual a TB50. Se observa un crecimiento exponencial y continuado en las dos cepas.

Tras la toma de muestras, hemos determinado la cantidad de ARN con el nanodrop y calculamos la cantidad a cargar en la electroforesis, partiendo de la teoría de que todas las muestras deben estar igualadas y debemos cargar 15  $\mu\text{g}$  de ARN.

Por tanto, al determinar la expresión de la  $\text{H}^+$ -ATPasa el resultado debe ser similar al de la cepa salvaje, es decir, con una expresión equivalente en ambos casos.



**Figura 21.** Northern Controles. Siendo T1 (termosensible TOR1) y T2 (termosensible TOR2). Resultado de la expresión del ARN de las muestras de levadura (arriba), y el control de carga de las muestras (abajo). Las muestras están expuestas según el tiempo de extracción.

## 4.2 Análisis de la cantidad de H<sup>+</sup>-ATPasa en mutantes de TOR

El gen *PMA1* codifica la protón ATPasa de membrana plasmática. El siguiente paso del presente proyecto fue analizar mediante la técnica de western la cantidad de protón ATPasa presente en la membrana plasmática en mutantes de las dos funciones de TOR. En el paso anterior hemos visto que existe una regulación a nivel de expresión del gen, y principalmente dependiente de TORC1. No obstante no se puede descartar que exista otro nivel de regulación a nivel de traducción o de estabilidad de la proteína, que sería fácilmente analizable por la técnica de western, puesto que contamos con anticuerpos policlonales específicos para la proteína.

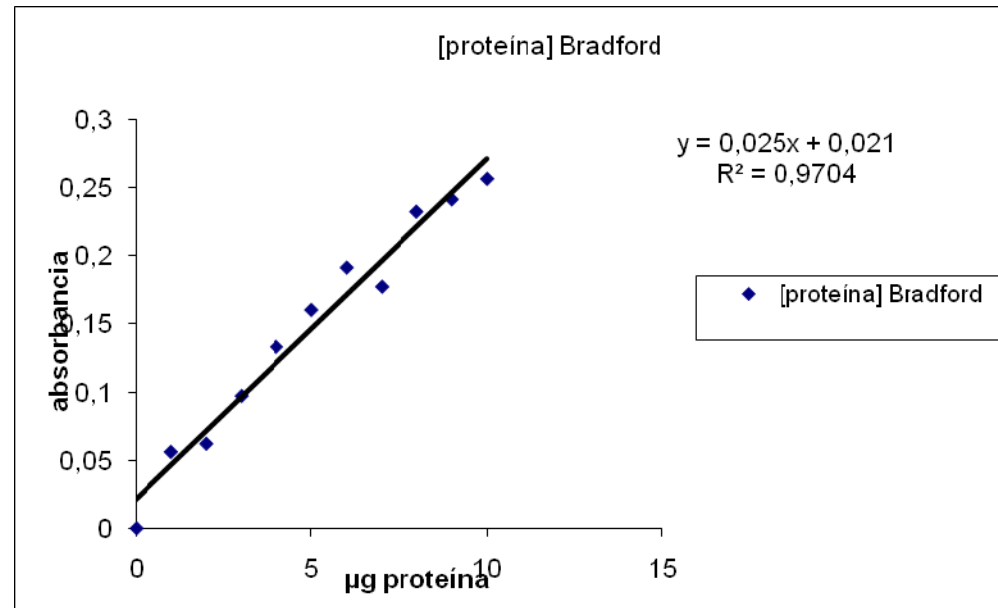
### 4.2.1 Cepas tratadas con rapamicina

Determinación de la cantidad de proteína tras su extracción de las células por el método de cuantificación Bradford. Formamos la curva patrón estándar como establece el método y a partir de la ecuación de la recta obtenemos la concentración en µg/µl que nos permitirá determinar la cantidad en µl que debemos cargar el gel de electroforesis para el análisis proteico. Ecuación:  $x = (y-0,02)/0,0258$ .

µg proteína	Absorbancia
0	0
1	0,056
2	0,062
3	0,097
4	0,133
5	0,16
6	0,191
7	0,177
8	0,232
9	0,241
10	0,256

**Tabla 4.** Patrón Bradford. Datos que forman la curva patrón.

La gráfica patrón Bradford presenta una ecuación de la recta formada por los puntos que nos permitirá determinar la concentración de proteína presente en cada muestra. Cabe destacar que cada vez que determinábamos la cantidad de proteína realizamos una valoración de un patrón de BSA. Solo se detalla el proceso y los cálculos en este apartado a modo de ejemplo.



**Figura 22.** Curva patrón Bradford.

Queda determinada la ecuación de la recta:

$$y = 0,025x + 0,021$$

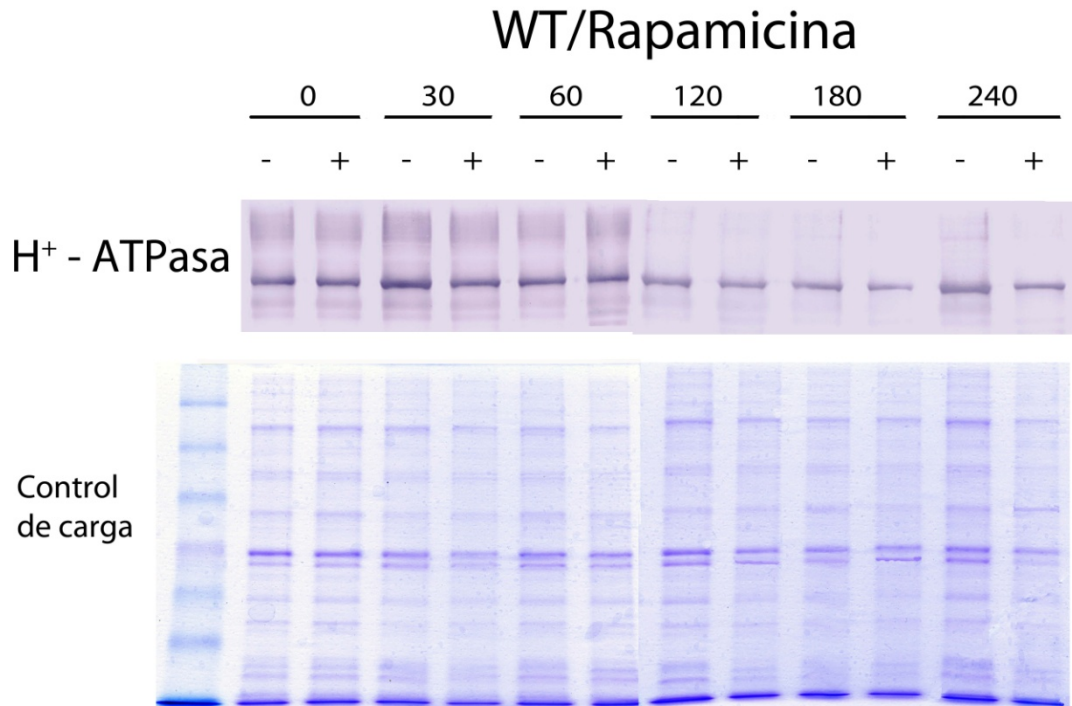
$$R^2 = 0,9704$$

Con ella calculamos la cantidad de proteína existente y la cantidad en µl a cargar en el gel.

Absorbancia	µg/µl proteína	10µg/muestra
0,182	6,279	1,6
0,166	5,659	1,8
0,134	4,419	2,3
0,218	7,674	1,3
0,207	7,248	1,4
0,245	8,721	1,1
0,129	4,225	2,4
0,142	4,729	2,1
0,209	7,326	1,4
0,148	4,961	2,0
0,117	3,760	2,7
0,168	5,736	1,7

**Tabla 5.** Cantidad de proteína de la serie Rapamicina. La primera columna es la absorbancia obtenida del lector de placas. La segunda es la concentración obtenida a partir de la ecuación de la recta y la tercera columna es la cantidad en µl a cargar en el gel.

La electroforesis y posterior transferencia a la membrana según el protocolo expuesto anteriormente, permiten detectar mediante un método de luminiscencia la proteína expresada en cada muestra, quedando reflejado en la siguiente figura.



**Figura 23.** Western wt/Rapamicina. Detección de la cantidad de proteína expresada en las diferentes muestras con o sin rapamicina. Como control de carga realizamos un gel cargado con idéntica cantidad de proteína que para el western, pero teñido con Coomassie para detectar proteínas totales.

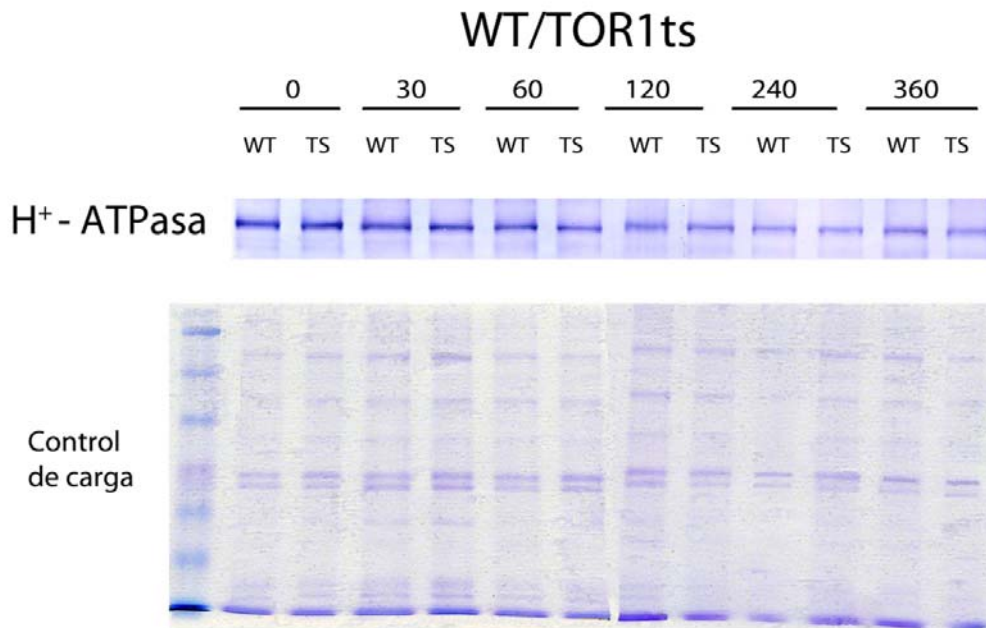
#### 4.2.2 Cepa con un alelo termosensible para TOR1

Calculamos la concentración de proteína existente en cada muestra según el método Bradford. La curva patrón que determina la ecuación de la recta es la establecida anteriormente. Con ella obtenemos los siguientes datos de concentración.

Absorbancia	µg/µl proteína	10µg/muestra
0,136	4,496	2,2
0,151	5,078	2,0
0,106	3,333	3,0
0,121	3,915	2,6
0,109	3,450	2,9
0,111	3,527	2,8
0,133	4,380	2,3
0,114	3,643	2,7
0,236	8,372	1,2
0,233	8,256	1,2
0,145	4,845	2,1
0,198	6,899	1,4

**Tabla 6.** Cantidad de proteína de la serie TOR1<sup>ts</sup>. La primera columna es la absorbancia obtenida del lector de placas. La segunda es la concentración obtenida a partir de la ecuación de la recta y la tercera columna es la cantidad en µl a cargar en el gel.

La diferencia en la cantidad de proteína expresada según el tratamiento sometido a las muestras queda reflejada tras la electroforesis y detección de la muestra.



**Figura 24.** Western wt/TOR1<sup>ts</sup>. Detección de la cantidad de proteína expresada en las diferentes muestras. El control de carga representa la cantidad de proteína total extraída en la muestra, la primera columna representa el patrón de pesos moleculares.

#### 4.2.3 Cepa con un alelo termosensible para TOR2

El método Bradford ha determinado las siguientes concentraciones.

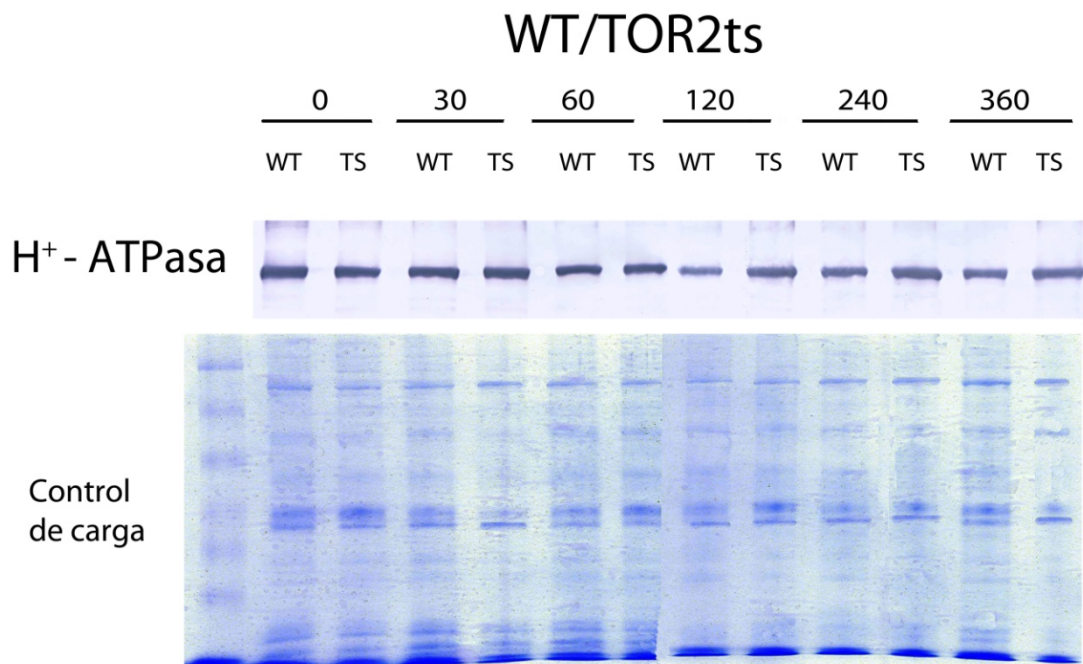
Ecuación:  $x = (y - 0,02) / 0,0258$ .

Absorbancia	µg/µl proteína	10µg/muestra
0,106	3,333	3,0
0,165	5,620	1,8
0,13	4,264	2,3
0,175	6,008	1,7
0,108	3,411	2,9
0,159	5,388	1,9
0,146	4,884	2,0
0,201	7,016	1,4
0,176	6,047	1,7
0,219	7,713	1,3
0,158	5,349	1,9
0,16	5,426	1,8

**Tabla 7.** Cantidad de proteína de la serie TOR2<sup>ts</sup>. La primera columna es la absorbancia obtenida del lector de placas. La segunda es la concentración obtenida a partir de la ecuación de la recta y la tercera columna es la cantidad en µl a cargar en el gel.

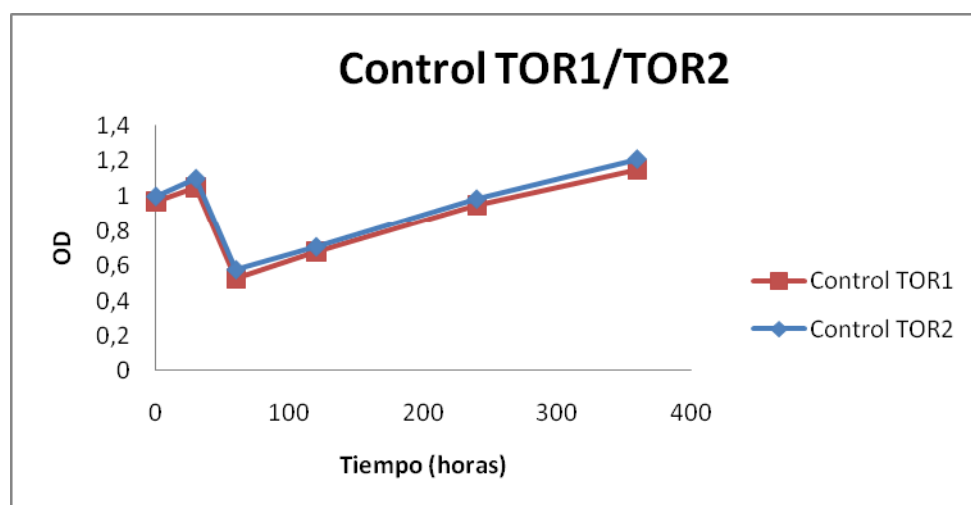


El resultado del análisis western de esta serie refleja la diferencia en la formación de la proteína ATPasa, mostrado en la siguiente figura:



**Figura 25.** Western wt/TOR2<sup>ts</sup>. Detección de la cantidad de proteína expresada en las diferentes muestras con o sin rapamicina. El control de carga representa la cantidad de proteína total extraída en la muestra, la primera columna representa el patrón de pesos moleculares.

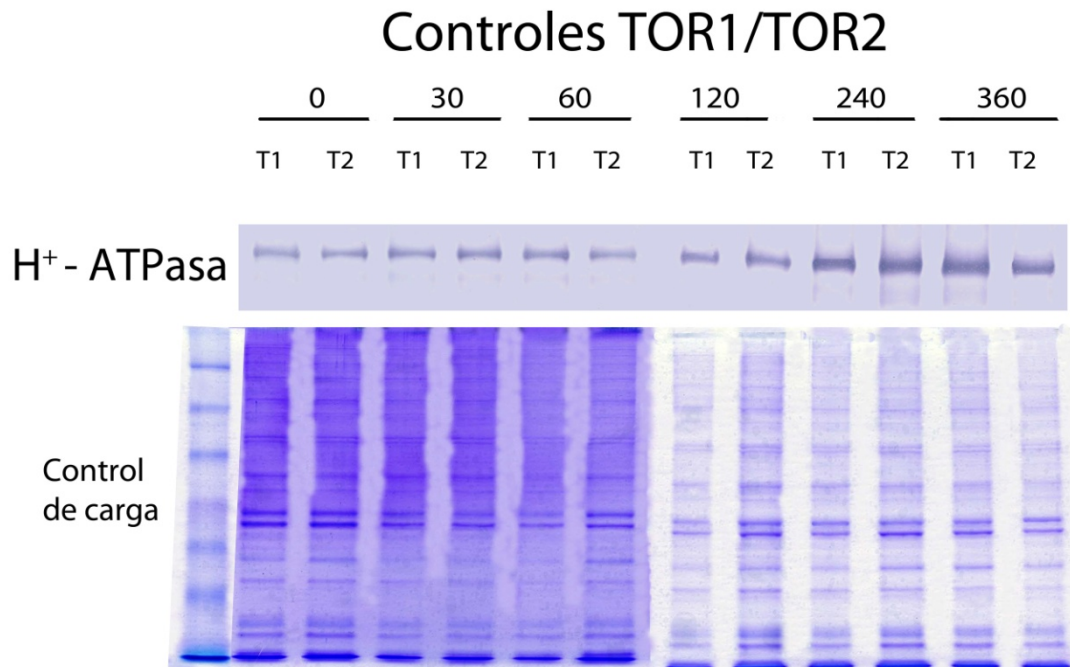
### Controles TOR1/TOR2



**Figura 26.** wt/TOR2<sup>ts</sup>. Gráfica que representa la variación de la OD del cultivo en condiciones normales y el cultivo termosensible respecto al tiempo.

Como era de esperar los dos controles crecen de forma similar y no se observa una reducción en el crecimiento ya que no están sometidos a condiciones desfavorables.

La diferencia en la cantidad de proteína expresada según el tratamiento sometido a las muestras queda reflejada tras la electroforesis y detección de la muestra.

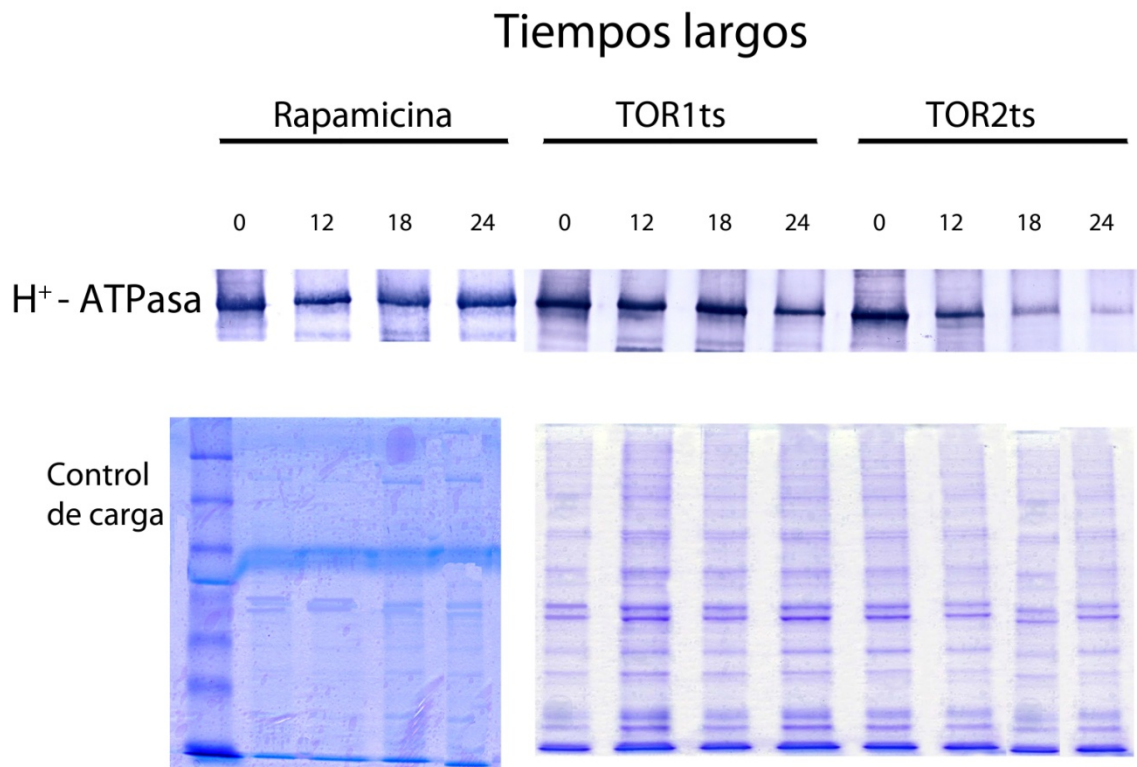


**Figura 27.** Western controles TOR1/TOR2. Detección de la cantidad de proteína expresada en las diferentes muestras crecidas a temperatura ambiente. La expresión debe ser equivalente a un wt. El control de carga representa la cantidad de proteína total extraída en la muestra.

#### Análisis de la cantidad de H<sup>+</sup> - ATPasa en membrana plasmática a tiempos largos

Tras el análisis de la cantidad de proteína expresada en las diferentes condiciones de cultivo y a diferentes tiempos, se ha observado que en la misma escala temporal en la cual se observaban diferencias notables en la expresión del gen, éstas no quedan reflejadas en la cantidad de proteína. Una hipótesis que explicara esa aparente disparidad de resultados sería que la proteína es muy estable y al tener una tasa de recambio baja el existe un retardo entre la disminución de la expresión y la desaparición de la proteína. Por tanto, se ha sometido a las cepas de lavadura a una mayor exposición a las diferentes condiciones de cultivo, ampliando el tiempo a 12, 18 y 24 horas. De esta forma se aprecian mejor las diferencias en la cantidad de proteína H<sup>+</sup> - ATPasa expresada.

El análisis western refleja la variación en la expresión de las diferentes muestras comparadas con sus respectivos controles, cuyo análisis a tiempos largos se encuentra posteriormente.

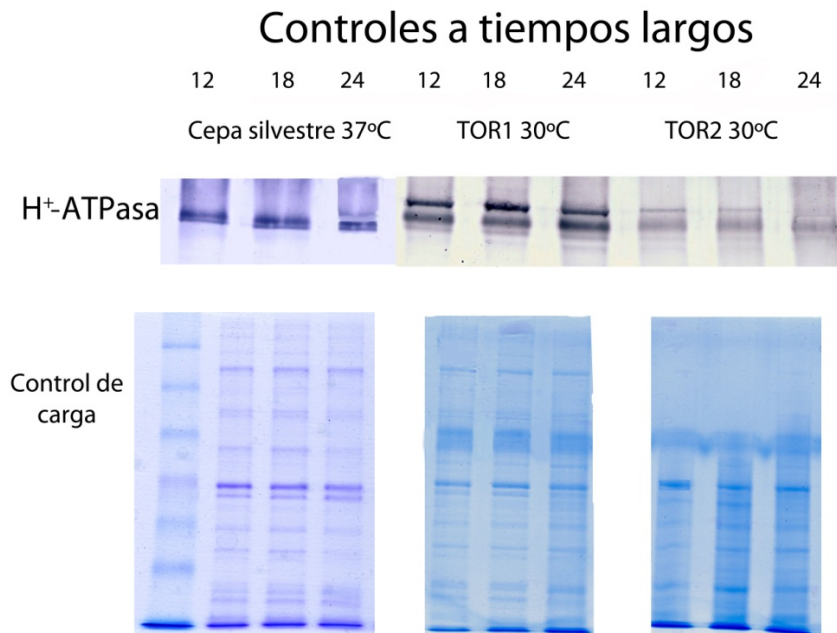


**Figura 28.** Western tiempos largos. Detección de la cantidad de proteína expresada en las diferentes condiciones a tiempos más largos. El control de carga representa la cantidad de proteína total extraída en la muestra.

### Controles a tiempos largos

Controles de todas las series anteriores pero a tiempos largos, equivalente a la serie anterior pero sin condiciones que afecten al crecimiento de los cultivos. Crecemos la cepa silvestre a 37°C que es la temperatura de inhibición de los termosensibles para ver que esto no afecta a su ciclo celular, TOR1 y TOR2 son crecidos a temperatura ambiente para ver que actúan como una cepa silvestre.

Aquí mostramos el resultado del análisis de la proteína.



**Figura 29.** Western de los controles a tiempos largos. Detección de la cantidad de proteína expresada en los diferentes controles a tiempos más largos. El control de carga representa la cantidad de proteína total extraída en la muestra.

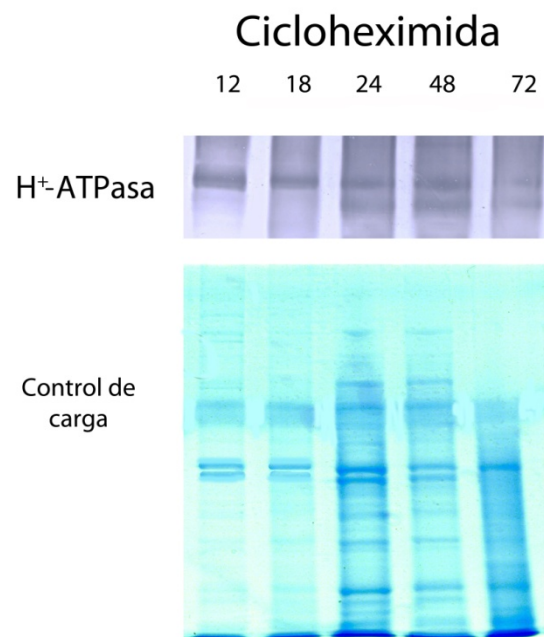
#### Determinación de la estabilidad de la protón ATPasa.

El hecho que el cambio en la expresión requiera de mucho tiempo para reflejarse en el nivel total de proteína apunta indirectamente a que la protón ATPasa es una proteína muy estable y con un bajo número de recambio. En la bibliografía este dato no aparece, por lo que juzgamos que en este punto del proyecto sería interesante medir la estabilidad de la protón ATPasa para a) confirmar nuestra observación sobre la estabilidad de la protón ATPasa, b) explicar la disparidad en los tiempos de inhibición a nivel de expresión del gen y de cantidad de proteína y c) aportar nueva información sobre una proteína básica en la homeostasis de iones en levadura como es Pma1. Para determinar la estabilidad de la proteína tratamos los cultivos con la droga cicloheximida, que bloquea la síntesis de proteínas.

La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas, y es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. Se utiliza para inhibir la síntesis de proteínas en células eucariotas *in vitro* de una manera rápida.

Esto hace que lo usemos como control para ver la decadencia en la expresión de la ATPasa de membrana plasmática. Insuflamos la droga a una concentración de 50 µg/ml.

La detección de la proteína Pma1 se refleja en la siguiente figura.

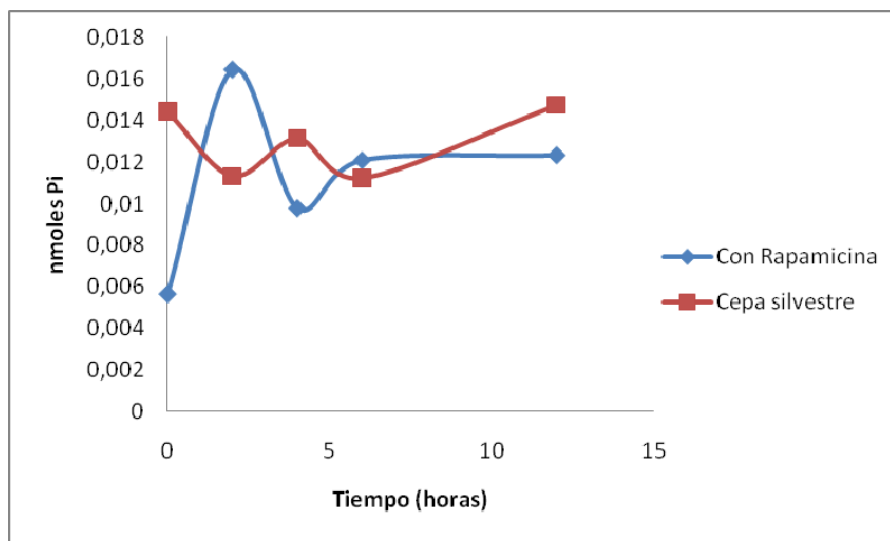


**Figura 30.** Western de la cepa tratada con cicloheximida. Detección de la cantidad de proteína expresada tras la acción de la droga. El control de carga representa la cantidad de proteína total extraída en la muestra. Obtenemos la expresión hasta las 72 horas del inicio del cultivo.

### 4.3 Actividad enzimática

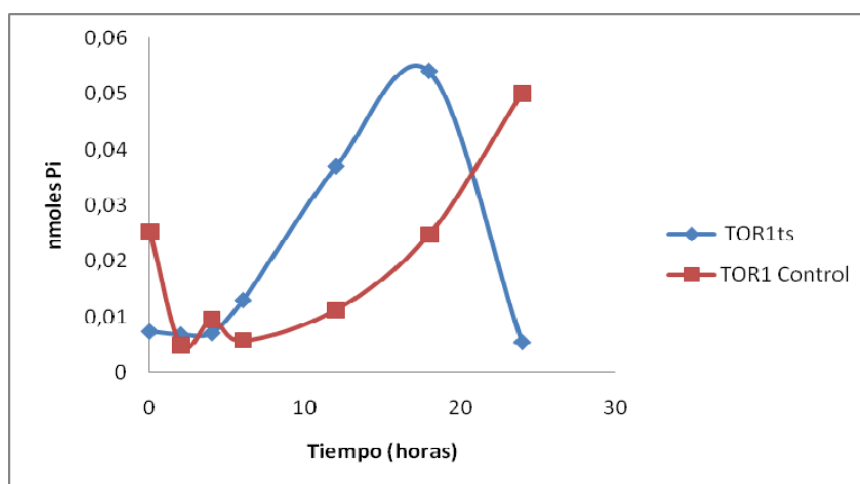
Por último analizamos la actividad de la protón ATPasa, medida en forma de consumo de ATP. Es sabido que la protón ATPasa tiene residuos fosforilados, por lo que no podemos descartar que el efecto de la ruta TOR sobre la protón ATPasa se realice a nivel de actividad de la proteína, posiblemente por fosforilación directa o por fosforilación/defosforilación mediante alguna proteína quinasa o proteína fosfatasa regulada por TOR como NPR1, YPK, o SIT4.

#### 4.3.1 Levaduras silvestres tratadas con rapamicina



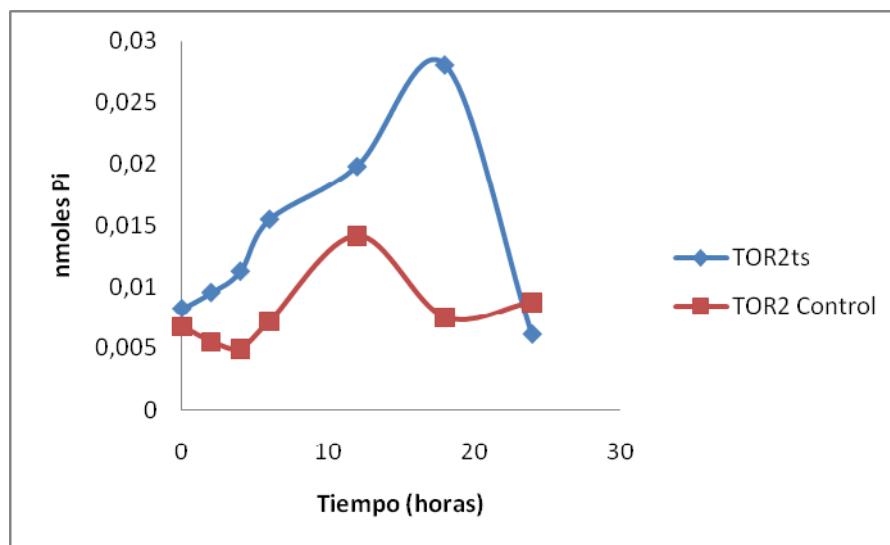
**Figura 31.** Actividad en cepas con rapamicina. Variación de los nmoles de fosfato a lo largo del tiempo representando la funcionalidad de la proteína  $H^+$ -ATPasa. La rapamicina provoca la inhibición del crecimiento de la cepa, por tanto la decaída de su actividad.

#### 4.3.2 Cepa con un alelo termosensible para TOR1



**Figura 32.** Actividad en cepas termosensibles para TOR1. Variación de los nmoles de fosfato a lo largo del tiempo representando la funcionalidad de la proteína  $H^+$ -ATPasa. La temperatura provoca la inhibición del crecimiento de la cepa, por tanto la decaída de su actividad.

### 4.3.3 Ceba con un alelo termosensible para TOR2



**Figura 33.** Actividad en cepas termosensibles para TOR2. Variación de los nmoles de fosfato a lo largo del tiempo representando la funcionalidad de la proteína  $H^+$ -ATPasa. La temperatura provoca la inhibición del crecimiento de la cepa, por tanto la decaída de su actividad.

## DISCUSIÓN



## Discusión

En el presente trabajo hemos estudiado la regulación a nivel molecular de la protón ATPasa de membrana plasmática por parte de la ruta TOR. Esta ruta es la principal responsable del control del crecimiento celular en presencia de nutrientes. La actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa se correlaciona con el crecimiento celular. Dicha proteína es la responsable de la generación del gradiente de pH que genera un potencial de membrana que es utilizado por la célula para transportar moléculas en un sentido y otro de la membrana. Puesto que la ATPasa se activa en presencia de nutrientes y TOR es responsable de la regulación en función del estado nutricional de la célula por lo que tenemos una evidencia indirecta de una relación entre estos dos procesos que nos sirve de hipótesis de partida. El objetivo del presente proyecto ha sido confirmar o descartar la observación de que la ruta TOR regula de alguna manera a la protón ATPasa de membrana plasmática.

Hemos estudiado la protón ATPasa a tres niveles diferentes (expresión del gen, cantidad de proteína y actividad de la proteína) en diferentes mutantes de la ruta TOR así como con células tratadas con rapamicina. La rapamicina bloquea el complejo TORC1 e induce que las células paren el ciclo celular y entren en la fase G<sub>0</sub>. Según nuestros resultados en estas condiciones vemos una disminución en la expresión del gen de la protón ATPasa, *PMA1*. Este efecto lo pudimos confirmar en la cepa de levadura que contiene un alelo termosensibles para TORC1, lo que nos permite descartar un error en nuestros resultados experimentales o que el efecto que veíamos sobre la expresión de *PMA1* fuera debido a un efecto de la rapamicina, independiente de su acción como agente inhibidor de TORC1. Por lo tanto ya hemos encontrado una relación a nivel molecular entre la ruta TOR y la regulación de *PMA1*. La inhibición de TOR induce una disminución en la expresión del gen *PMA1*. Tradicionalmente se consideraba que la expresión del gen *PMA1* es constitutiva, pero nosotros hemos encontrado unas condiciones fisiológicas en las cuales la expresión de este gen se reprime.

El efecto de la inhibición de TORC2 no podemos estudiarlo de dos formas diferentes, puesto que dicho complejo es insensible a la rapamicina, por lo que hemos estudiado si hay una disminución en la expresión del gen *PMA1* utilizando una cepa que contiene un alelo termosensible.

En los análisis Northern observamos una disminución en la expresión de *PMA1*, pero a tiempos más largos y de una magnitud mucho menor que la inhibición observada al bloquear TORC1, por lo que no podemos descartar un efecto indirecto debido a la despolarización del citoesqueleto.

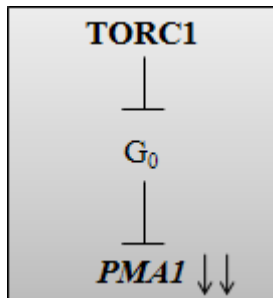
En este trabajo hemos determinado también como incidía esta inhibición observada en la expresión del gen en la cantidad total de proteína Pma1. Manteniendo las mismas condiciones que en el análisis anterior, tanto en las muestras como en el tiempo, no se apreciaban grandes diferencias entre los controles y las cepas tratadas, por lo que hemos

realizado el estudio a tiempos más largos (12, 18 y 24 horas). Ahora las diferencias son mayores y sí que se observa una disminución de la cantidad de proteína formada, principalmente en células tratadas con rapamicina o en termosensibles de TORC1.

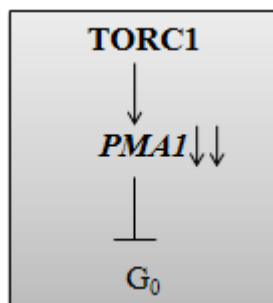
En un análisis de tipo western podemos detectar la cantidad total de proteína en un momento determinado. Esta cantidad es el resultado de dos procesos diferentes, por un lado la síntesis de proteína y por otro la degradación. Es sabido que la regulación de la cantidad total de proteína puede llevarse a cabo regulando cualquiera de los dos factores (síntesis: alteración en la expresión del gen, o en menor medida, regulación de la estabilidad o de la traducción del RNA mensajero; degradación: regulación de la degradación de la proteína). Nuestros resultados indican que esta disminución de la expresión apenas tiene incidencia en la cantidad total de proteína, por lo que podemos deducir que la protón ATPasa es una proteína muy estable. Para confirmar o descartar esta explicación hemos incluido un nuevo tratamiento en este análisis. La cicloheximida provoca la inhibición de la síntesis proteica y esto nos sirve para medir la estabilidad de la protón ATPasa. Hemos cultivado las levaduras con dicha droga a tiempos largos (12, 18, 24, 48 y 72 horas) y observamos que la proteína va decayendo a tiempos largos, la H<sup>+</sup>-ATPasa es una proteína muy estable ya que su decadencia se aprecia a partir de las 48 horas. Inhibiendo TORC1 a tiempos similares observamos una caída en la cantidad de la protón ATPasa.

Por último, hemos estudiado la actividad enzimática, ya que la actividad de la protón ATPasa puede regularse por modificaciones post-traduccionales (fosforilación) por lo que la cantidad de proteína presente en la membrana puede o no correlacionar con la actividad de la proteína. Por lo tanto no tenemos datos de la funcionalidad de la proteína en condiciones de inhibición de TORC1 o de TORC2. En condiciones en las cuales hay una inhibición de TORC1 se observa que a tiempos cortos aparece un aumento de la actividad de la protón ATPasa, mucho más acusada en el alelo termosensible que en las células tratadas con rapamicina. A tiempos más largos sí que se observa una caída de la actividad respecto del control, ya sea después del tratamiento con rapamicina o en el alelo termosensible. Curiosamente en la cepa control a 37 °C también se observa un aumento de la actividad, lo que podría indicarnos que una activación debida al aumento de la temperatura o un efecto indirecto de la aceleración del metabolismo que se produce al crecer las células a 37 °C. En las cepas mutantes para TORC2 se observa este efecto dependiente de la temperatura, que es incluso mayor que en el control, y una mínima caída, de la actividad que se observa a tiempos largos.

En definitiva: sabemos que la inhibición de TORC1, ya sea con rapamicina o con un alelo termosensible, induce un bloqueo del ciclo celular y la entrada en fase  $G_0$ . Nuestros resultados indican que esta misma inhibición de TORC1 provoca una disminución de la expresión del gen *PMA1*, que codifica a la protón ATPasa. Ahora solo resta establecer un modelo que permita unir estos tres factores. Proponemos dos modelos alternativos:



**Modelo 1: Efecto indirecto.** La inhibición de TORC1 hace que la célula entre fase  $G_0$  y una de las muchas consecuencias a nivel molecular es que se reduce la expresión del gen.



**Modelo 2: cooperante necesario.** En condiciones de crecimiento normal TORC1 activa *PMA1* y esto es necesario para acumular masa y la progresión del ciclo celular. Inhibir TORC1 reprime la expresión de *PMA1* y este es un paso necesario para entrar en  $G_0$ .

Decidir cuál de estas dos hipótesis es la correcta queda fuera del ámbito del presente trabajo, de cara a un futuro estamos construyendo cepas que expresen *PMA1* bajo la dirección de un promotor constitutivo para observar el efecto fisiológico que tiene evitar la inhibición de *PMA1* (que es la aportación principal del presente trabajo) en condiciones de bloqueo de TORC1.

## CONCLUSIONES

## Conclusiones

La hipótesis de partida se ha demostrado correcta y hemos podido encontrar una relación a nivel molecular entre la ruta TOR y la protón ATPasa. Concretamente:

1. La expresión del gen *PMA1* se reprime por la inhibición de TORC1. Esta represión se observa en menor medida y a tiempos más largos en mutante TORC2.
2. En condiciones de inhibición de TORC1 observamos una caída de la cantidad de proteínas a tiempos muy largos. Este retraso se debe a que la vida media de la proteína Pma1p es muy larga, como hemos demostrado tratando células con cicloheximida.
3. También hemos detectado una caída de la actividad de la protón ATPasa que correlaciona con la inhibición de TORC1.

## BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía

1. Ambesi, A *et al.* Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **J. Exp. Biol.** (2000) 203:155–160.
2. **Analytical Biochemistry.** (2009) 384:189-190.
3. Apse, MP *et al.* Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. **Science** (1999), 285:1256-1258.
4. Ariño J *et al.* Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** (Mar. 2010) 95–120.
5. Aronova, S *et al.* Probing the membrane environment of the TOR kinases reveals functional interactions between TORC1, actin, and membrane trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell.** (2007), 18:2779-2794.
6. Aronova, S *et al.* Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. **Cell Metab.** (2008) 7:148–158.
7. Bañuelos, MA *et al.* The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. **Microbiology** (1998) 144:2749–2758.
8. Barquilla, A *et al.* Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (2008), 105:14579-14584.
9. Bickle, M *et al.* Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. **EMBO J.** (1998) 17:2235–2245.
10. Bishop, NA and Guarente L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. **Nat. Rev. Genet.** (2007), 8:835-844.
11. Briskin, DP. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase oh Higher Plant Cell: Biochemistry and Transport Function. **Biochimica et Biophysica Acta.** (1990) 1019:95-109.
12. Clemens, S *et al.* The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (1998), 95:12043-12048.
13. Conway, EJ and Duggan, F. A cation carrier in the yeast cell wall. **Biochem. J.** (1958) 69:265–274.

14. Cook, M and Tyers, M. Size control goes global. **Curr. Opin. Biotechnol.** (2007), 18:341-350.
15. Cutler, AJ and Krochko, JE. Formation and breakdown of ABA. **Trends. Plant. Sci.** (1999), 4:472-478.
16. Cybulski, N and Hall, MN. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. **STBS** (2009), 34: 12.
17. Diaz-Troya, S *et al.* The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. **Autophagy** (2008), 4:851-865.
18. Drobak, BK and Watkins, PA. Inositol(1,4,5) triphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. **FEBS Lett.** (2000), 481:240-244.
19. Gaber, RF *et al.* TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** (1988) 8:2848–2859.
20. Guy, L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annu. Rev. Plant. Physiol.** (1990), 41:187–223.
21. Harmon, AC *et al.* CDPKs: a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? **Trends Plant Sci.** (2000), 5:154-159.
22. Hayashi, T *et al.* Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. **Genes Cells** (2007), 12:1357-1370.
23. Helliwell *et al.* TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** (1998) Jan; 148(1):99-112.
24. Hirschi, KD. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. **Plant Cell** (1999), 11:2113-2122.
25. Ichimura, K *et al.* Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. **Plant J.** (2000), 24:655-665.
26. Jones, HG *et al.* Introduction: some terminology and common mechanisms. **Plants Under Stress. Cambridge university Press.** (1989), 1–10.



27. Kamada, Y *et al.* Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. **Mol. Cell. Biol.** (2005) 25:7239–7248.
28. Kane, PM. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** (2006) 70:177–191.
29. Klionsky, DJ *et al.* The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. **Microbiol. Rev.** (1990) 54:266–292.
30. Knight, H *et al.* Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **Plant J.** (1997), 12:1067-1078.
31. Ko, CH *et al.* TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** (1990) 125:305–312.
32. Lempiainen, H *et al.* Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. **Mol. Cell.** (2009), 33:704-716.
33. Loewith, R *et al.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol. Cell** (2002) 10:457–468.
34. Marín-Manzano, MC *et al.* Heterologously expressed protein phosphatase calcineurin downregulates plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity at the post-translational level. **FEBS Lett.** (2004) 8; 576(1-2):266-70.
35. Martínez-Muñoz, GA and Kane, P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. **J. Biol. Chem.** (2008) 283:20309-20319.
36. Matsuo, T *et al.* Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. **Mol. Cell. Biol.** (2007), 27:3154-3164.
37. Mayer, C *et al.* mTOR- dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. **Genes Dev.** (2004), 18:423-434.
38. Mikolajczyk, M *et al.* Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. **Plant Cell** (2000), 12:165-178.
39. Mulet, JM *et al.* Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. **J. Biol. Chem.** (2006) Nov 3; 281 (44):33000-7.

40. Munnik, T *et al.* Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. **Plant J.** (1999), 20:381-388.
41. Nass R *et al.* Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. **J Biol Chem.** (1997) 17; 272(42):26145-52.
42. Otsubo, Y and Yamamoto, M. TOR signaling in fission yeast. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** (2008), 43:277-283.
43. Pardo, JM *et al.* Stress signaling through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (1998), 95:9681-9686.
44. Persson, BL *et al.* Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta** (1998) 1365:23–30.
45. Pritchard, DI. Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens. **Drug Discovery Today** (2005) 10, 10:688–691.
46. Reinke, A *et al.* TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** (2004) 279:14752– 14762.
47. Rodríguez-Navarro, A and Ramos, J. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** (1984) 159:940–945.
48. Rodríguez-Navarro, A. Potassium transport in fungi and plants. **Biochim. Biophys. Acta** (2000) 1469:1–30.
49. Rubio, F *et al.* Genetic selection of mutations in the high affinity K<sup>+</sup> transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na<sup>+</sup> permeability and increased Na<sup>+</sup> tolerance. **J. Biol. Chem.** (1999), 274:6839-6847.
50. Serrano, R and Villalba, JM. Bomba de protones de la membrana vegetal. **Investigación y ciencia** (En. 1993). 196.
51. Serrano, R and Rodríguez-Navarro, A. Ion homeostasis during salt stress in plants. **COCB** (2001), 13:399–404.

- 
52. Shi, H *et al.* The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (2000), 97:6896-6901.
  53. Souillard, A *et al.* TOR signaling in invertebrates. **COCB** (2009), 21:825–836.
  54. Sturgill, TW *et al.* TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. **Eukaryot. Cell** (2008) 7:1819–1830.
  55. Sussman, MR and Harper, JF. Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. **The Plant Cell** (1989), 1:953-960.
  56. Urban, J *et al.* Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell.** (2007), 26:663-674.
  57. Vézina, C *et al.* Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. **J. Antibiot** (1975) 28, 10:721–6.
  58. White, PJ. The molecular mechanism of sodium influx to root cells. **Trends Plant Sci.** (1999), 4:245-246.
  59. Woo, SY *et al.* PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. **J. Biol. Chem.** (2007) 282:25604–25612.
  60. Wullschleger, S *et al.* Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **J. Biol. Chem.** (2005) 280:30697–30704.
  61. Wullschleger, S *et al.* TOR signaling in growth and metabolism. **Cell** (2006), 124:471-484.
  62. Libro: Serrano, R. Métodos de bioquímica y biología molecular. UPV (España) (1993).