

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSIAMN)



Regulación de la proteína kinasa controladora del crecimiento celular TORC1 por pH

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autora: **Élide Ferrer Montero**

Tutor: **Prof. Ramón Serrano Salom**

Cotutora: **Dra. María Dolores Planes Ferrer**

Curso 2017-2018

Valencia, julio de 2018



Datos del trabajo de fin de grado

- Título: Regulación de la proteína kinasa controladora del crecimiento celular TORC1 por pH
- Autora: Élide Ferrer Montero
- Tutor Académico: Prof. Ramón Serrano Salom
- Cotutora: Dra. María Dolores Planes Ferrer
- Lugar y fecha: Valencia, julio de 2016

Resumen

El control del crecimiento en células animales se efectúa por dos tipos de sistemas celulares activados por dos tipos de sistemas celulares activados por señales externas: el sistema bioquímico con receptores, proteínas kinasas y factores de transcripción; y el sistema biofísico con transportadores de iones y de calcio. Ambos sistemas están desregulados en cáncer y las terapias están orientadas a corregirlos. Un pH intracelular (pH_i) alto es una característica universal de células en crecimiento activo pero los sensores de este parámetro promotor del crecimiento celular son desconocidos. En este trabajo hemos encontrado evidencia preliminar en el sistema de levadura de que al bajar el pH_i con ácidos débiles (sorbico, propiónico) se inhibe la fosforilación de la proteína ribosomal S6, un sustrato indirecto de la ruta TORC1, medida con anticuerpos específicos. Como la ruta TORC1 es un regulador maestro de crecimiento y proliferación celular, su inhibición a pH ácido podría explicar la inhibición del crecimiento observada en estas condiciones.

Palabras clave

Crecimiento; *Saccharomyces cerevisiae*; proteína kinasa TORC1; proteína ribosomal S6; pH_i ; ácidos débiles; anticuerpos;

Abstract

Growth control of eukaryotic cells is effected by two kinds of systems activated by external signals: the biochemical systems with receptors, protein kinases and transcription factors; and the biophysical systems with ion transporters and sensors of proton and calcium concentrations. Both systems are dysregulated in cancer and therapies are directed to correct them. A high intracellular pH (pH_i) is a universal feature of actively growing cells but the sensors of this parameter promoting growth are unknown. In this work we have utilized specific antibodies and found preliminary evidence with the

yeast model system that lowering pH_i with weak organic acids inhibits phosphorylation of the ribosomal protein S6, an indirect substrate of the TORC1 pathway. As the TORC1 pathway is a master regulator of cell growth and proliferation, its inhibition at acid pH_i could explain the observed inhibition of cell growth and proliferation under these conditions.

Key words

Growth; *Saccharomyces cerevisiae*; protein kinase TORC1; protein ribosomal S6; pH_i ; weak acids; antibodies;

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ramón Serrano por haberme dado la oportunidad de vivir esta experiencia laboral en su laboratorio, donde me he encontrado con gente maravillosa como Edu, Joan, Gaetano, Bea y Sira, entre otros, con los que he tenido un buen ambiente de trabajo y siempre han estado dispuestos a ayudarme. También, quiero agradecer a mi co-tutora Lola por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio y haberme guiado en este trabajo.

Quiero agradecer a mis amigas de toda la vida que me han apoyado y motivado prácticamente día a día, además de entender mi ausencia en este último mes. También quiero agradecer a Pablo porque siempre me ha valorado mucho como trabajadora y eso me ha hecho confiar en mi misma, además de haberme apoyado tanto en este último mes.

Por otra parte, agradecer los cuatro años de vida que me han dado mis amigos de la universidad, con los que comparto ilusiones y estilo de vida, tanto en el campo laboral como social.

Estos últimos meses han sido realmente difíciles y mi familia es lo más importante para mí. Por ello, no es menos agradecerles todo este tiempo que han estado apoyándome y aguantándome, tanto mis padres Salva y Elide, como mis hermanos Boro y Nacho, sin los cuales no habría sido capaz, moralmente, de llegar a donde he llegado. Soy una persona con diabetes desde los 11 meses de edad y eso a veces crea debilidades. Gracias al esfuerzo de mis padres y la manera que han tenido durante 21 años de afrontar las dificultades, han hecho de mí una persona muy fuerte y que pocas veces se rinde. A pesar de que durante este trabajo haya habido momentos malos, les agradezco todo lo que lucharon y siguen haciéndolo por haber hecho la persona que soy y, con ello, haber hecho este trabajo.

Por último, me gustaría dedicar unas palabras a Inma López, a todas las demás personas que fallecieron por cáncer y a todas aquellas que siguen luchando día a día contra él. Me gustaría que este trabajo fuera un principio de un fin, que todas estas personas enfermas y sus familiares dejaran de sufrir.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2.	Cáncer.....	2
1.2.1.	Importancia de la regulación del pH	3
1.2.2.	pH _i y pH _e de células cancerosas	3
1.3.	Proteínas kinasas y fosfatasa.....	3
1.4.	Cdk (Proteínas kinasas dependientes de ciclinas) y ciclinas	5
1.5.	Proteínas TOR.....	6
1.5.1.	Estructura de los dominios de TOR	6
1.5.2.	Complejo TORC1.....	7
1.5.3.	Complejo TORC2.....	8
1.5.4.	Ruta de TORC1 (diferencias entre mamíferos y levaduras)	9
2.	OBJETIVOS.....	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1.	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.2.	Medios y condiciones de cultivo	12
3.2.1.	Medio YPD	12
3.2.2.	Tampón salino de Succinato.....	12
3.2.3.	Condiciones de cultivo.....	12
3.2.4.	Preparación del cultivo inóculo	13
3.2.5.	Preparación de subcultivos	13
3.2.6.	Preparación de cultivos tratados con ácidos débiles para bajar pH _i	13
3.2.6.1.	Ácido sórbico	13
3.3.	Aislamiento de las proteínas de levadura	13
3.4.	Electroforesis, teñido y desteñido	14
3.4.1.	Soluciones requeridas	14
3.4.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	14
3.5.	Transferencia a membrana (Western blot).....	15
3.5.1.	Soluciones y materiales requeridos.....	15
3.5.2.	Transferencia	15
3.5.3.	Tinción con Direct Blue (DB71).....	16
3.6.	Inmunodetección	16
3.6.1.	Anticuerpos empleados.....	16
3.6.2.	Soluciones empleadas	18
3.6.3.	Purificación del anticuerpo secundario Anti-rabbit	18
3.6.4.	Inmunoblot	18
3.7.	Control de carga	19

3.7.1.	Método del papel	19
3.7.2.	Método de las absorbancias.....	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1.	Efecto de los ácidos débiles sobre el crecimiento de la cepa de levadura BY4741	21
4.2.	Control de carga	22
4.2.1.	Método del papel	22
4.2.2.	Control de carga mediante el método de las absorbancias y volúmenes	24
4.3.	Revelado de los Western blots de la proteína RPS6	25
4.3.1.	Revelado de membranas tras la primera purificación del segundo anticuerpo	26
4.3.2.	Revelado de membranas tras la segunda purificación del segundo anticuerpo	27
4.3.3.	Análisis de áreas de las bandas de las membranas	28
5.	DISCUSIÓN	32
5.1.	Efecto de los ácidos sórbico y propiónico	32
5.2.	Efecto de la acidificación en la ruta de TOR.....	32
6.	CONCLUSIÓN.....	35
7.	BIBLIOGRAFÍA	36

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos débiles.

Figura 2. Actividad de las proteínas kinasas y fosfatasa.

Figura 3. Complejos Cdk-ciclina relacionados en el control del ciclo celular humano y de levaduras *S. cerevisiae*.

Figura 4. Estructura de los dominios de TOR.

Figura 5. Complejo TOR 1 (TORC1) y complejo TOR 2 (TORC2) de *S. cerevisiae*.

Figura 6. Subunidades conservadas de TORC2.

Figura 7. Caracterización del anticuerpo fosfo-específico Rps6.

Figura 8. Detección quimioluminiscente de las bandas de proteínas.

Figura 9. Absorbancias de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 tras añadir distintas concentraciones de ácido sórbico a tiempo cero.

Figura 10. Absorbancias de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 a distintas concentraciones del ácido propiónico añadidas al tiempo cero.

Figura 11. Ecuación realizada para la obtención del volumen de cada muestra a cargar en el gel.

Figura 12. Membrana cargada con las cantidades calculadas mediante el método del papel.

Figura 13. Fórmula para calcular el volumen a aplicar de cada muestra.

Figura 14. Membrana cargada con las cantidades calculadas mediante el método basado en las absorbancias.

Figura 15. Gel teñido con Commassie blue (A); membrana tratada con el anticuerpo primario Anti-RPS6-P (B); membrana tratada con anticuerpo primario Anti-RPS6 (C). Membranas tras la primera purificación del anticuerpo secundario.

Figura 16. Gel teñido con Commassie blue (A); membrana tratada con el anticuerpo primario Anti-RPS6-P (B); membrana tratada con anticuerpo primario Anti-RPS6 (C). Membranas tras la segunda purificación del anticuerpo secundario.

Figura 17. Adaptación de la Figura 16B (A) y adaptación de la Figura 16C (B), recortando las réplicas 2 y 3.

Figura 18. Análisis de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo primario Anti-RPS6.

Figura 19. Análisis de las bandas de la membrana trata con el anticuerpo primario Anti-RPS6-P.

Figura 20. Resumen de las rutas de activación e inhibición de la proteína kinasa TORC1.

Figura 21. Esquema de la hipótesis de este trabajo.

Tabla 1. Tabla de absorbancias a 610 mn de las muestras

Tabla 2. Volúmenes de muestra a cargar en función del cálculo de la Figura 11.

Tabla 3. Tabla de volúmenes a cargar en función de las absorbancias.

Tabla 4. Cociente de las áreas de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y de las áreas de las bandas de RPS6 total.

Tabla 5. Análisis estadístico de las áreas de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo RPS6.

Tabla 6. Cociente de las áreas de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y de las áreas de las bandas de RPS6 total.

Tabla 7. Análisis estadístico de las áreas de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo Anti-RPS6-P.

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia
APS: Persulfato de Amonio
ATP: adenosin trifosfato
Cdk: kinasa dependiente de ciclinas
ClH: ácido clorhídrico
DB: Direct Blue
GFP: Green Fluorescent Protein
H₂O MilliQ: agua purificada por el sistema MilliQ de Millipore
kDa: kilo Dalton
MDa: mega Dalton
min: minutos
mM: mili Molar
nm: nanometros
pH_e: pH extracelular
pH_i: pH intracelular
P_m= Peso molecular
RNA_m: Ácido ribosómico mensajero
rpm: revoluciones por minuto
Ser: serina
TCA: ácido Tricloroacético
TEMED: tetrametiletilendiamina
Thr: treonina
TOR: Target Of Rapamycin
TRIS: tris(hidroximetil)amino metano

1. INTRODUCCIÓN

Existe una correlación universal entre crecimiento celular y pH intracelular (citoplásmico, pH_i) alto ($\approx 7.2-7.4$; Nuccitelli y Deamer, 1982; Reshkin *et al.*, 2014) y aunque se desconocen los mecanismos de este fenómeno, se ha demostrado que el pH_i alto es causa y no efecto del rápido crecimiento celular (Perona y Serrano, 1988). Ello ha dado lugar a nuevas estrategias contra el cáncer basadas en inhibir los sistemas que transportan protones fuera de las células (Parks *et al.*, 2013).

Una hipótesis simple sería que algún sistema regulador del crecimiento respondiera a cambios de pH_i . Los reguladores más importantes del crecimiento y proliferación celular son las rutas de las proteínas kinasas TORC1 (TOR Complex 1; Dazert y Hall, 2011) y Cdks (proteínas kinasas activadas por ciclinas; Morgan, 1997), pero su regulación por pH_i apenas ha sido investigada. En el presente trabajo se ha estudiado en el sistema modelo de levadura el efecto de bajar el pH_i sobre el estado de fosforilación de un sustrato indirecto de TORC1 y estos resultados preliminares apuntan a que la ruta TORC1 se inhibe cuando se acidifica el interior de las células con ácidos débiles como propiónico y sórbico.

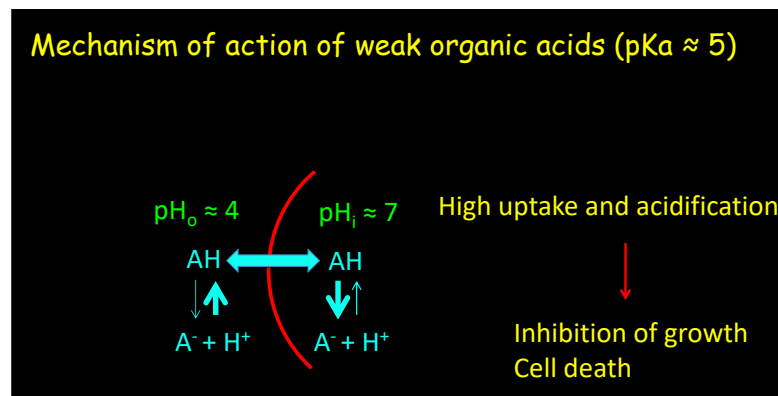


Figura 1. Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos débiles. Los ácidos débiles entran y salen de la célula en su forma no disociada (AH) y se disocian en su interior, cediendo protones en el medio intracelular.

1.1. Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae ha sido conocido desde la antigüedad como la levadura del pan y del vino. Además, se ha convertido en un organismo de estudio común en el laboratorio.

La investigación biotecnológica ha mantenido el uso tradicional que se ha hecho de esta levadura, mejorando e innovando los procesos de panificación y de producción de bebidas alcohólicas. A la vez,

este organismo ha ganado protagonismo en el laboratorio al convertirse en un potente modelo biológico de organismos eucariotas.

Se trata de un hongo unicelular ascomiceto que alterna dos fases biológicas estables durante su vida: haploide y diploide. Ambas formas se reproducen de forma asexual por gemación, aunque en condiciones muy determinadas la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente. Por una parte, la fase haploide permite generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad. Por otra, en la fase diploide se pueden realizar estudios de complementación. Una levadura haploide contiene 16 cromosomas que varían en tamaño de 200 a 2200 kilobases.

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

Una ventaja adicional de esta levadura se trata del conocimiento de la secuencia completa de su genoma, además de mantenerse en constante revisión, lo que permite la manipulación genética de los aproximadamente 6000 genes que codifica el genoma de levadura y estudios a escala genómica de la expresión génica, entre muchos otros aspectos. Al tratarse de un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, la levadura se puede utilizar para los estudios de células que resultarían muy complicados en organismos multicelulares (ARTES BLANCAS, 2009).

1.2. Cáncer

Durante los últimos 30 años ha predominado en la biología del cáncer un abordaje centrado en genes, creando así, una idea del cáncer como una colección compleja de enfermedades no relacionadas entre sí. De la misma manera que se ha estado llevando a cabo terapias adaptadas para cada paciente basadas en el patrón de expresión génica de tumores.

Hoy en día, se está produciendo un importante giro hacia la búsqueda de los principios subyacentes fundamentales que podrían formar una teoría unificadora de la transformación y progresión celular y, finalmente, la metástasis. Por tanto, el estudio del cáncer como una enfermedad única podría permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas más generales que aprovechen las fuerzas subyacentes comunes, donde entra el paradigma central del pH (Reskhin *et al.*, 2018).

1.2.1. Importancia de la regulación del pH

El pH_i es importante para la actividad de un gran número de enzimas con un pH óptimo que se encuentra dentro del rango del pH fisiológico, así como para la eficiencia de los elementos contráctiles y la conductividad de los canales de iones. Además, la oscilación del pH parece ser importante en el control del ciclo celular y la capacidad proliferativa de las células (Madshus, 1988).

1.2.2. pH_i y pH_e de células cancerosas

Las células normales de mamífero presentan valores de pH_i entre 7.0 y 7.01 y un pH_e de entre 7.3 y 7.4. Las células cancerosas presentan un balance ácido-base que es completamente diferente al que se observa en los tejidos normales y que aumenta con el creciente estado neoplásico: un microambiente extracelular (pH_e) ácido unido a un "maligno" pH intracelular (pH_i) alcalino. Concretamente, las células tumorales presentan valores de pH_i entre 7.3 y 7.7, es decir, niveles más altos/básicos que las células normales; y valores de pH_e entre 6.2 y 6.9, más bajos/ácidos que las células normales (7.3-7.4). Esto crea un gradiente de pH inverso ($pH_i > \Delta pH_e$) a través de la membrana celular que se encuentra marcadamente desplazado del equilibrio electro-químico por la fuerte expulsión de protones, que incrementa a medida que progresa el tumor.

Una respuesta temprana que es común en células eucariotas a estímulos que activan su proliferación es un aumento del pH_i . En células animales es a causa de la activación del sistema de intercambio Na^+/H^+ ; en hongos y plantas una ATPasa bombreadora de protones realiza esta función. La cuestión crítica es si esta alcalinación intracelular es simplemente coincidente con o consecuencia de la activación de la proliferación celular o si es una señal reguladora de la misma. En estudios previos se expresó el gen de levaduras de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en fibroblastos (tipo celular característico del tejido conectivo). Las células resultantes tenían un pH_i elevado y adquirieron propiedades tumorigénicas, sugiriendo que el gen de la ATPasa de levadura se comportaba como un oncogén en células de mamífero. Estos experimentos apoyan un papel crucial del pH_i en el control del crecimiento en células animales (Perona y Serrano, 1988).

1.3. Proteínas kinasas y fosfatasas

En la regulación de la actividad de las proteínas en eucariotas, las modificaciones post-traduccionales constituyen un proceso importante. Una de las principales modificaciones es la fosforilación reversible de proteínas, que puede llegar a alcanzar a un 3% de todas las proteínas

celulares, de una manera transitoria. El patrón de fosforilación de las proteínas de una célula está determinado por la acción de proteínas kinasas (que fosforilan otras proteínas), y de proteína fosfatasas, que catalizan el proceso inverso, denominado desfosforilacion. El origen y desarrollo de muchas patologías, con amplia incidencia en la población, como es el cáncer, se debe a la acumulación de modificaciones en la función de muchas de estas proteínas que alteran el programa normal de proliferación, diferenciación, muerte y migración celular (Manning *et al.*, 2002).

Las proteínas kinasas se caracterizan porque catalizan la unión covalente de un grupo fosfato a partir de un nucleótido trifosfato donador (normalmente ATP), hacia residuos de serina, treonina y / o tirosina de sus sustratos (Figura 2). La reacción de fosfotransferencia requiere la presencia de tres sitios específicos: un sitio de unión de ATP, un dominio que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP, y un sitio para la unión del sustrato (Hubbard y Cohen, 1993). Dependiendo del aminoácido al que ataque pueden clasificarse en tres grupos: fosfotransferencia hacia residuos de serina o treonina (Ser/Thr kinasas); fosfotransferencia a tirosina (Tyr kinasas) y hacia cualquiera de ellas, es decir, con especificidad dual.

Las proteínas fosfatasas realizan el proceso inverso, la desfosforilación que consiste en la catálisis de la hidrólisis del enlace éster fosfórico. De la misma manera que las kinasas, se dividen en tres grupos dependiendo la especificidad de la catálisis: Ser/Thr fosfatasas, Tyr fosfatasas y las que presentan especificidad dual.

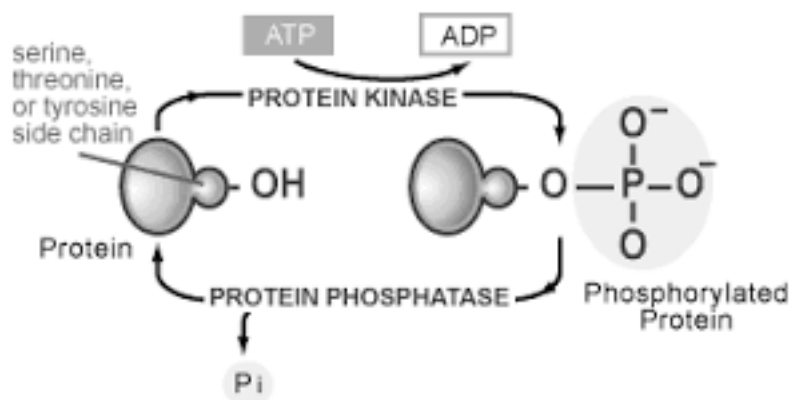


Figura 2. Actividad de las proteínas kinasas y fosfatasas. La fosforilación de las proteínas tiene lugar en el lado izquierdo y la desfosforilación en el lado derecho. Generalmente se asume que la fosforilación es la reacción regulada, pero en algunos casos la desfosforilación está también regulada.

1.4. Cdk (Proteínas kinasas dependientes de ciclinas) y ciclinas

Las proteínas kinasas dependientes de ciclinas (Cdks) son serina/treonina kinasas y se asocian con subunidades reguladoras conocidas como ciclinas, que controlan la actividad de la kinasa y la especificidad del sustrato.

Los complejos Cdk/ciclina se estudiaron por primera vez en levaduras y se observó su implicación en el control del ciclo celular. En dicho estudio se descubrió que una sola Cdk (Cdc28 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; Cdc2 en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*) promueve transiciones entre diferentes fases del ciclo celular a través de sus interacciones con varias ciclinas específicas de fase. Como observamos en la Figura 3, en *S. cerevisiae*, la función de Cdc28 en G1 requiere un set de 3 ciclinas G1, Cln1-3, con funciones solapantes. Una familia parcialmente redundante de 6 ciclinas, Clb 1-6, manda la entrada a la fase S (primero Clb5, 6) y a la mitosis (Clb1-4). Por tanto, las ciclinas se consideran los engranajes que se cambian para ayudar a la transición entre las fases del ciclo.

En consecuencia, las Cdks se percibieron como el motor que impulsa la progresión del ciclo celular. Por otra parte, la actividad kinasa de los complejos Cdk/ciclina se encuentra estrechamente regulada por una gran cantidad de inhibidores de las Cdks (CKIs), ya que en condiciones desfavorables tienen la función de detener la progresión del ciclo celular a través de los complejos Cdk/ciclina. Digamos que la interacción de las Cdks con las ciclinas es activadora y la interacción con los CKIs es inhibitoria.

A parte de su función bien establecida en el control del ciclo celular, comienza a ser bastante aparente que las Cdks de mamíferos, las ciclinas y los CKIs juegan papeles imprescindibles en procesos tales como la transcripción, la regulación epigenética, el metabolismo, la autorenovación de células madre, funciones neuronales y la espermatogénesis (Lim y Kaldis, 2013).

En cuanto a las ciclinas, se trata de una familia de proteínas bastante diversa, que varían en tamaño desde 35 a 90 kDa. Los miembros distantes de la familia no suelen parecer estar relacionados en el nivel de secuencia primaria. En cambio, la homología de secuencia tiende a concentrarse en una sección de 100 residuos conocida como ciclina, que es necesaria para la unión y activación de Cdk (Morgan, 1997).

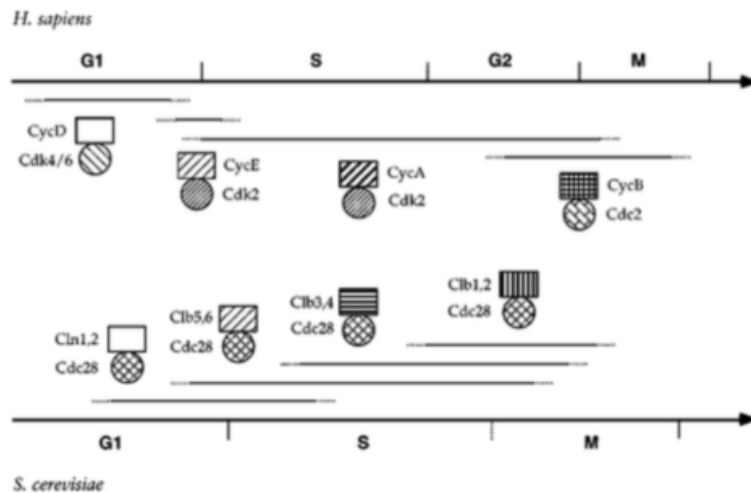


Figura 3. Complejos Cdk-ciclina relacionados en el control del ciclo celular humano y de levaduras *S. cerevisiae*. Las líneas indican aproximadamente la sincronización de la activación y de la función de los complejos indicados. Marca de que las fases S y M se solapan en *S. cerevisiae* (Morgan, 1997).

1.5. Proteínas TOR

TOR (*Target Of Rapamycin*) es una kinasa serina/treonina altamente conservada se encuentra en dos complejos multiproteicos estructural y funcionalmente diferentes, llamados complejo TOR1 (TORC1) y complejo TOR2 (TORC2). Pertenece a la familia PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase*), kinasa relacionada con la fosfatidilinositol kinasa pero que fosforila proteínas y no fosfatidilinositol. La mayoría de eucariotas presentan un único gen TOR, en cambio, varias levaduras como *S. cerevisiae* y *S. pombe* tienen dos genes TOR (TOR1 y TOR2) que codifican dos proteínas altamente homólogas (Tor1 y Tor2). En levaduras, tanto Tor1 como Tor2 pueden formar parte de TORC1, pero TORC2 solo contiene Tor2.

TOR es la diana de la rapamicina, aunque de los dos complejos TOR únicamente TORC1 es sensible a ella. La rapamicina es un macrólido producido por *Streptomyces hygroscopicus* que actúa inhibiendo su actividad. Este metabolito se emplea como droga inmunosupresora y en el tratamiento contra el cáncer (González *et al.*, 2015).

1.5.1. Estructura de los dominios de TOR

En la Figura 4 podemos ver los dominios conservados de las proteínas TOR. Observamos repeticiones HEAT en tándem (sitio de unión de subunidades) que van desde el dominio NH2 terminal hasta aproximadamente la mitad de la proteína. Siguiendo en esta línea, encontramos el dominio FAT

central, seguido por el FRB, la kinasa y los dominios FATC, encontrándose estos últimos próximos al dominio COOH terminal.

El modelado de la estructura terciaria de TOR consta, en la mayor parte de la proteína (excepto el dominio kinasa), de unidades repetidas helicoidales. mTOR (mammalian TOR) está regulada por los nutrientes (aminoácidos y energía) y por los factores de crecimiento para modular las tasas de crecimiento celular y el ciclo de progresión celular, los cuales controlan coordinadamente la proliferación celular. La rapamicina, junto a su receptor FKBP12, se une directamente al dominio FRB para inhibir la ruta de señalización dependiente de mTORC1 (Fingar y Blenis, 2004).

La ruta de señalización controla la actividad de una gran variedad de kinasas que ayudan a mantener los procesos anabólicos y los procesos catabólicos antagónicos como la autofagia y la degradación de RNA_m (González *et al.*, 2015).

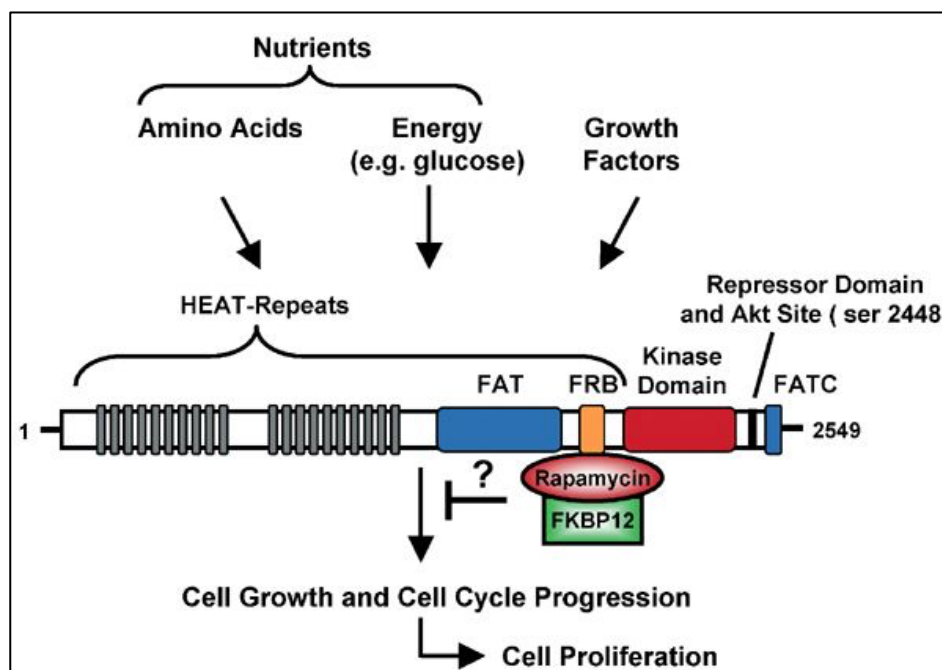


Figura 4. Estructura de los dominios de TOR (Fingar y Blenis, 2004).

1.5.2. Complejo TORC1

TORC1 está compuesto por la proteína Tor1 o Tor2 y por las subunidades Tco89, Kog1 y Lst8 como podemos observar en la Figura 5 (Wullschleger *et al.*, 2006; Loewith *et al.*, 2002). TORC1 tiene un tamaño alrededor de 2 MDa y el complejo completo es multimérico, probablemente dimérico.

En cuanto a su localización celular, cuando las subunidades Tco89, Kog1 y Lst8 se encuentran marcadas con GFP, se observa que TORC1 se concentra en la membrana vacuolar. Además, la vacuola de levadura es un importante reservorio de nutrientes y la señalización de TORC1 responde a señales de nutrientes. Es decir, si las condiciones son favorables en cuanto a presencia de nutrientes y ausencia de estrés, TORC1 responde promoviendo el crecimiento celular a través de la biogénesis de ribosomas, la activación de la síntesis de proteínas y la traducción de RNA, además de la importación de nutrientes. En cambio, si existe estrés o tratamiento con rapamicina, TORC1 responde de la misma manera que a la ausencia de nutrientes, teniendo lugar una caída dramática en la síntesis de proteínas, inducción de la autofagia y la salida del ciclo celular y la entrada en un estado de reposo G0 (Loewith *et al.*, 2002).

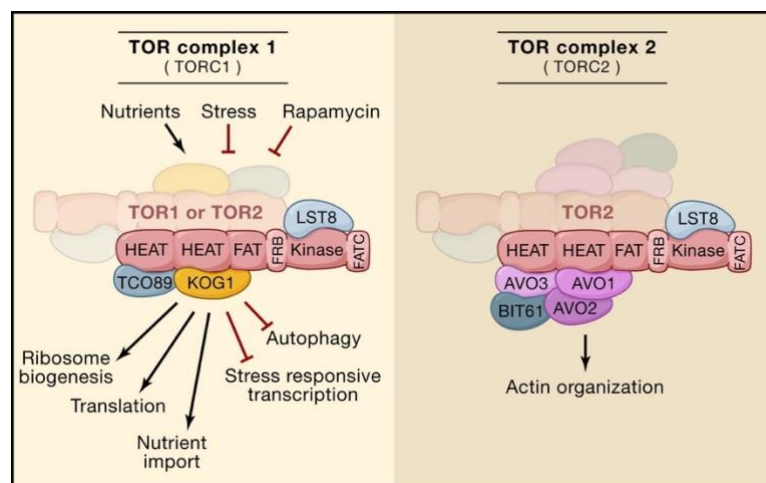


Figura 5. Complejo TOR 1 (TORC1) y complejo TOR 2 (TORC2) de *S. cerevisiae* (Wullschleger *et al.*, 2006).

1.5.3. Complejo TORC2

TORC2 está compuesto por las subunidades Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y/o su parólogo Bit2, Lst8, y la proteína Tor2 como observamos en la Figura 5 (Wullschleger *et al.*, 2006; Loewith *et al.*, 2002). Todas ellas están bastante conservadas y son esenciales excepto Avo2, que se trata de una subunidad específica de TORC2 de levaduras (Figura 6) y presenta una localización periférica (Gaubitz C. *et al.*, 2016). También tiene un tamaño alrededor de 2 MDa y se trata de un complejo multimérico, probablemente dimérico ensamblado a través de una interacción Tor2-Tor2 (Wullschleger *et al.*, 2006).

Aunque TORC1 y TORC2 sean dos complejos multiproteicos similares, presentan distintas funciones entre ellos. A pesar de que TORC2 no sea sensible a la rapamicina y por ello se conozca menos su ruta, se sabe que, en levaduras, la kinasa AGC Ypk1 es el mayor sustrato de TORC2 y mediante esta vía, TORC2 regula la presión de turgencia y la tensión de la membrana plasmática. Por otra parte, regula la polarización del citoesqueleto de la actina y se encuentra presente en el proceso de endocitosis. Esto se contrasta con la localización de TORC2, ya que existen estudios que la localizan en el citoplasma o cerca de la membrana plasmática (Gaubitz C. *et al.*, 2016).

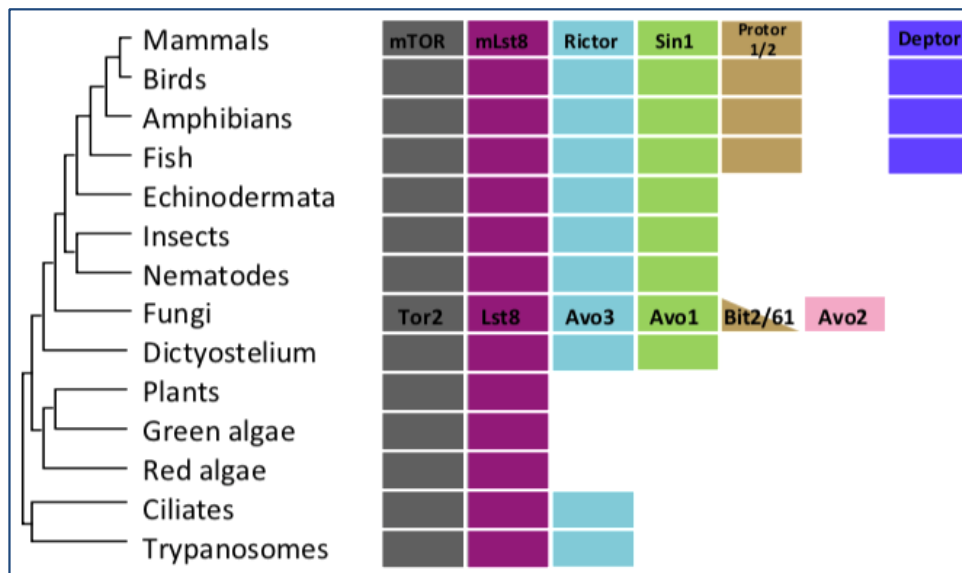


Figura 6. Subunidades conservadas de TORC2. Subunidades conservadas de TORC2 entre el reino eucariota. Se encuentran los nombres de las proteínas de los mamíferos (mTOR, mLst8, Rictor, Sin1, Protor ½ y Deptor) y de las de levadura (Tor2, Lst8, Avo3, Avo1, Bit2/61 y Avo2). TOR y Lst8 forman el núcleo de TORC1 y de TORC2 y se conservan en todos los eucariotas con la excepción de algunos parásitos intracelulares (Gaubitz *et al.*, 2016).

1.5.4. Ruta de TORC1 (diferencias entre mamíferos y levaduras)

En mamíferos, las proteínas kinasas de la familia AGC (proteína kinasa A/proteína kinasa G/ proteína kinasa C) son dianas para la TORC1 y TORC2 de mamífero (mTORC1 y mTORC2). La kinasa ribosomal S6 (S6K) es la diana mejor caracterizada para mTORC1. S6K requiere la fosforilación de Thr389 en un motivo hidrofóbico mediada por mTORC1, así como la fosforilación mediada por PDK1 (kinasa fosfoinositido dependiente 1) en su dominio de activación para estar muy activa. S6K mamífera fosforila la proteína S6 de la subunidad 40S ribosomal en 5 residuos de Serina (Ser235/236/240/244/247) para promover la transcripción de los genes requeridos para la biogénesis del ribosoma. Por tanto, la fosforilación de S6 es uno de los puntos más sensibles en la ruta de señalización dependiente de mTORC1.

En *S. cerevisiae*, las kinasas AGC Sch9 y Ypk3 por una parte y Ypk1/2 por otra son dianas directas de TORC1 y TORC2, respectivamente. Se considera que Ypk3 es el ortólogo funcional de la S6K de mamíferos (Yerlikaya *et al.*, 2016). La S6 de levadura (Rps6) está codificada por dos pautas de lectura independientes abiertas, *RPS6A* y *RPS6B*, las cuales provienen de una duplicación del genoma. Existen dos sitios de fosforilación (Ser232 y Ser233) en la región C-terminal de la *Rps6a* y de la *RPS6b* que corresponden con Ser235 y Ser236 en la proteína humana (González *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son dos:

1. Determinar las concentraciones de los ácidos sórbico y propiónico que inhiben parcialmente el crecimiento de levadura en fase exponencial.
2. Determinar mediante detección con anticuerpos específicos la cantidad de proteína ribosomal RPS6 total y fosforilada en cultivos control y tratados con ácidos sórbico y propiónico para estimar la actividad de TORC1 e intentar obtener evidencia preliminar de que TORC1 se inhibe al acidificar el interior de las células.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Colección de Ramón Serrano	Genotipo	Referencia
RS-259	BY4741 (<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>)	Winzeler et al., 1999

3.2. Medios y condiciones de cultivo

3.2.1. Medio YPD

YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) es el medio más completo con el que se puede crecer levaduras en el laboratorio, concretamente, es el que se suele usar para el crecimiento de *S. cerevisiae*. En él se incluye extracto de levadura, 1% en proporción peso/volumen con el agua, 2% de peptona, 2% de glucosa como fuente de energía y agua hasta el volumen deseado.

Algunas cepas en crecimiento con mutaciones en la ruta de biosíntesis de adenina generan un compuesto de color rosado que puede llegar a ser tóxico, por ello se añade adenina extra a 30 µg/ml final para bloquear el principio de la ruta y el medio se conoce como YPDA.

3.2.2. Tampón salino de Succinato

Compuesto por Succinato 0.5 M llevado a pH 3.7 con TRIS base 2 M. Este tampón se añade al medio YPDA diluyéndolo 10 veces para ajustar el pH aproximadamente a 4.0.

3.2.3. Condiciones de cultivo

La levadura utilizada crece en medio de cultivo YPDA en agitación a una temperatura de 28°C.

Los medios de cultivo empleados son previamente esterilizados en el autoclave en las siguientes condiciones: 20 min, 120 °C y 1 atm.

3.2.4. Preparación del cultivo inóculo

Partiendo de una colonia de la cepa BY4741, se prepara un inóculo en 2 mL de YPDA en tubos estériles de 15 ml y se incuba a 28°C toda la noche en un agitador rotatorio hasta que se alcanza la fase estacionaria. Se conservó en frío (7°C) hasta su uso en posteriores subcultivos.

3.2.5. Preparación de subcultivos

Para llegar a las condiciones óptimas de trabajo las cuales son presentar una absorbancia a 600 nm alrededor de 1 tras incubar toda la noche, se llevaron a cabo distintos subcultivos. Se inocularon en matraces de 500 ml con 90 ml de YPDA y 10 ml de tampón succinato los siguientes volúmenes del cultivo: 0.3 µL, 0.6 µL, 0.8 µL, 1 µL y 1.5 µL.

3.2.6. Preparación de cultivos tratados con ácidos débiles para bajar pH_i

3.2.6.1. Ácido sórbico

Partiendo del ácido sórbico ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}_3$; $P_m=112,13$ g/mol) sólido de la casa Sigma, se preparó una solución stock 1 M en etanol ya que éste ácido presenta una baja solubilidad en H_2O .

Se inocularon distintas cantidades de la solución stock (5 µL, 10 µL, 20 µL y 30 µL) en matraces de volúmenes de 100 mL con 20 mL del cultivo en fase exponencial ($\text{Abs} \approx 1$), llegando a unas concentraciones de 0.25 mM, 5 mM, 1 mM y 1.5 mM respectivamente.

3.2.6.2. Ácido propiónico

Partiendo del ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) 1M ($P_m=96,06$ g/mol) sólido de la casa Sigma, se preparó una solución stock 1M disuelta en H_2O .

Se inocularon distintas cantidades de la solución stock, partiendo de las mismas que las del ácido sórbico y siguiendo con 100 µL, 200 µL y 300 µL, en matraces de volúmenes de 100 mL con 20 mL del cultivo en fase exponencial ($\text{Abs} \approx 1$), llegando a unas concentraciones de 5 mM, 10 mM y 15 mM, respectivamente, ya que se trata de un ácido menos tóxico.

3.3. Aislamiento de las proteínas de levadura

Se trasvasan los subcultivos a tubos de 15 mL y se centrifugan (3 min, 3000 rpm). Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento de levaduras con 100 µL del tampón de muestra de

Laemmli 1X, previamente calentado a 95°C. Tras agitar los tubos con un agitador Vortex, se trasvasa el contenido a microtubos de 1.5 mL y se incuban durante 10 min a 95°C. Finalmente, se guardan congelados hasta su utilización, requiriendo tras descongelar una incubación de 5 min a 95 °C.

3.4. Electroforesis, teñido y desteñido

3.4.1. Soluciones requeridas

- Tampón de empaquetamiento 2X: 0.25 M Tris y 0.2% SDS, llevado a pH 6.8 con ClH.
- Tampón de separación 2X: 0.75 M Tris y 0.2% SDS llevado a pH 8.8 con ClH.
- Tampón de electroforesis 10X: 144 g/l glicina (1.92 M) y 1% SDS llevado a pH 8.3 con Tris (aproximadamente 0.3 M Tris). Se usó el tampón de electroforesis 1X, por lo que se diluyó 10 veces con H₂O MiliQ.
- Acrilamida y bisacrilamida: (38% y 2%, respectivamente, peso/volumen). La concentración total es 40% y el cociente acrilamida/bisacrilamida es 19. Esta reacción produce el mínimo tamaño de poro para cualquier concentración total de acrilamida. Disolver en agua, filtrar con filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm y guardar congelada.
- Solución de teñir: 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250 en 50% metanol y 10% ácido acético.
- Solución de desteñir: 10% metanol y 10% de ácido acético.

3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realiza una electroforesis en minigel de poliacrilamida al 10% (8 x 4 cm) y de 1 mm de grosor para separar las proteínas en función de su tamaño. Esto se debe a que el detergente anionico SDS se une inespecíficamente a todas las proteínas y las desnaturaliza, convirtiéndolas en estructuras uniformes, independientes de la estructura nativa, de manera que la gran cantidad de moléculas negativas de SDS enmascara las cargas eléctricas de los amino ácidos. Por tanto, la movilidad electroforética de los complejos depende solo del peso molecular de las proteínas y no de su composición.

Se utilizó el sistema MiniProtean Electrophoretic System de BioRad. La preparación de las placas de vidrio requiere limpiarlas previamente con detergente no alcalino y luego con etanol de grado técnico para eliminar la grasa. Seguidamente se montan los cristales en posición vertical presionados por pinzas. El gel presenta dos capas diferentes:

- Gel de separación: se trata de la capa inferior la cual se prepara mezclando 3 ml del tampón de separación, 1.2 ml de acrilamida al 8%, 1 ml de H₂O MiliQ, 40 µL de APS al 10% y 4 µL de TEMED. Estos dos últimos componentes son necesarios para que se produzca la polimerización, por lo que la mezcla se vierte rápidamente entre los cristales. Se puede añadir isopropanol para eliminar las burbujas y obtener una superficie plana. La polimerización tarda entre 15-30 min, momento en el que se añade la segunda capa.
- Gel de empaquetamiento: se trata de la capa superior, compuesta por 1.2 mL de tampón de empaquetamiento, 0.2 mL de acrilamida 8%, 1 mL de H₂O MiliQ, 20 µL de APS 10% y 2µL de TEMED. La mezcla se vierte entre los cristales y se coloca inmediatamente el peine introduciéndolo correctamente para evitar que el aire inhiba la polimerización. Una vez haya polimerizado, se retira el peine cuidadosamente y se vierte H₂O destilada para eliminar restos de sales. A continuación, se dispone a correr el gel colocando los cristales entre los dos electrodos dentro de la cubeta con tampón de electroforesis 1X. Finalmente se cargan las muestras, el marcador (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) y se cierra el sistema conectándolo a una fuente de alimentación que proporcionará una corriente de 15 mA (Laemmli, 1970).

3.5. Transferencia a membrana (Western blot)

3.5.1. Soluciones y materiales requeridos

- Tampón de transferencia original (Towbin et al.): 14.4 g/l glicina (0.19 M), 25 mM Tris, y 20% metanol (pH 8.3).
- Membrana de transferencia: Immobilon-P (PVDF, polivinilideno difluoruro) de la casa Millipore.
- Papel de filtro Whatman 3 MM.

3.5.2. Transferencia

Una vez corrido el gel, las proteínas se encuentran separadas en función de su peso molecular y para transferirlas a la membrana de PVDF se tiene que humedecer con metanol (4 s) debido a que ésta no es muy hidrofílica. Seguidamente, tanto la membrana como el papel de filtro se humedecen

con el tampón de transferencia, se forma un “sandwich” con el papel, la membrana y el gel, y se coloca en la cubeta. Se cierra el sistema conectándolo a una fuente de alimentación que proporcionará un voltaje de 10 V y se dejará a temperatura ambiente durante toda la noche (Towbin *et al.*, 1997).

3.5.3. Tinción con Direct Blue (DB71)

Tras transferir las proteínas a la membrana, se procede a la tinción con la solución DB71 al 0,008%, la cual se prepara a partir de 4 mL de la solución “stock” DB71 al 0,1 % y enrasando hasta 50 mL con la solución de lavado (500 mL H₂O miliQ, 400 mL etanol absoluto y 100 mL acético glacial). Se tiñe durante 15 min con dicha solución en el balancín y tapado con papel de aluminio para proteger el colorante de la luz y, posteriormente, se lava durante 15 min con la solución de lavado. Se escanea la membrana para obtener una imagen nítida de las bandas teñidas y finalmente se destiñe incubándola 15 min en la solución de desteñir (350 mL H₂O miliQ, 500 mL etanol absoluto y 150 mL bicarbonato sódico 1M) para su posterior inmunodetección (Cong *et al.*, 2009).

3.6. Inmunodetección

3.6.1. Anticuerpos empleados

Los anticuerpos policlonales utilizados se producen inmunizando animales con proteína purificada (anti-RPS6) o con un fosfopéptido sintético que corresponde a los residuos que rodean a las serinas fosforiladas (anti-RPS6-P). Estos tienen ciertas ventajas y desventajas frente a los anticuerpos monoclonales. Entre las ventajas destaca el reconocimiento de múltiples epítomos en una proteína, una mayor sensibilidad debido a los múltiples lugares de unión de anticuerpo en cada proteína, un menor coste y una mayor tolerancia a condiciones variables.

- Anticuerpo primario Anti-RPS6 contra la subunidad 6, extraído de conejo y que presenta reactividad para las especies: ratón, rata, humano, *S. cerevisiae*, *S. pombe*. Concentración de 100 µg a 1 mg/ml. Se trata de un anticuerpo policlonal de isotipo IgG. Es de la casa Abcam (Inglaterra) y se utilizó a una dilución 1: 300 (González *et al.*, 2015).
- Anticuerpo primario Anti-RPS6-P contra la región fosforilada de la subunidad 6, extraído de conejo y que presenta reactividad para las especies: humano, ratón, rata, mono y *S. cerevisiae*. Este anticuerpo detecta la proteína S6 ribosomal únicamente cuando existe fosforilación en las dos serinas terminales. Como vemos en la Figura 7, dichas serinas están conservadas en *S.*

cerevisiae, que corresponden en dicho organismo con las serinas 232 y 233. Es un anticuerpo policlonal de isotipo IgG de la casa Cell Signaling Technology (Waltham, MA, USA) y se utilizó a una dilución 1:1000.

H.sapiens_S6a: KRRRLSSLR²³⁸
S.pombe_Rps6a: KARRASSLK²³⁸
S.pombe_Rps6b: KARRASSMK²³⁸
S.cerevisiae_Rps6a: RKRRASSLK²³⁵
S.cerevisiae_Rps6b: RKRRASSLK²³⁵

Figura 7. Caracterización del anticuerpo fosfo-específico Rps6. Secuencia de los péptidos de C-terminal de la S6 humana y en sus ortólogos *S. pombe* y *S. cerevisiae*. Los residuos fosforilados se encuentran marcados en rojo.

- Anticuerpo secundario: Amersham ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (hecho en burro; código NA934; GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). El anticuerpo secundario empleado está conjugado con peroxidasa (HRP). La reacción entre dicha enzima y el sustrato produce luz, que en nuestro caso fue detectada por el método de quimioluminiscencia mediante el aparato LAS-3000 FUJI. Las ventajas de dicho método empleado son que es un método muy sensible, la membrana puede tratarse para ser reutilizada y posibilidad de hacer múltiples exposiciones en películas de rayos X (ADVANSTA, 2011).
- Kit empleado para la inmunodetección: GE Healthcare Reactivo de detección de inmunotransferencia (Western blotting) Amersham™ ECL™ Prime. Permite el uso de anticuerpos primarios y secundarios muy diluidos sin reducir la sensibilidad con este reactivo de detección. Este reactivo de detección produce una sensibilidad e intensidad de señal elevadas. El contenido del kit es una solución A (solución de luminol, 50 ml) y solución B (solución de peróxido, 50 mL). La reacción entre dichos compuestos que dan como producto luz detectable es catalizada por la peroxidasa que está conjugada al anticuerpo secundario empleado.

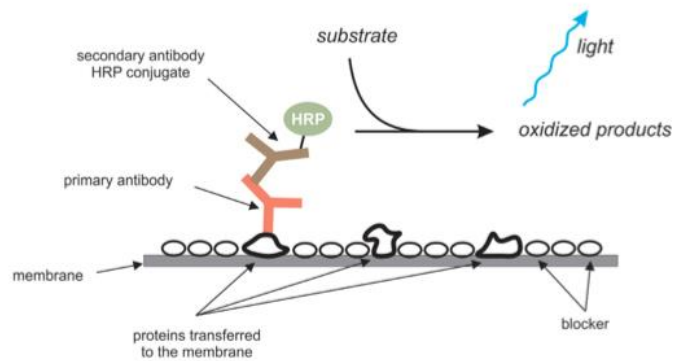


Figura 8. Detección quimioluminiscente de las bandas de proteínas (ADVANSTA, 2011).

3.6.2. Soluciones empleadas

- Solución de bloqueo: TBS-T (0.1 % Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL pH 7.6) y 1 % de BSA [Bovine Serum Albumin 98% de pureza, de la casa Sigma-Aldrich].
- Solución de lavado: TBS-T (0.1 % Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL pH 7.6).
- Solución de *stripping*: 10 ml de 1M glicina, 2 ml de SDS al 10%, 38 ml H₂O miliQ, ajustando el pH a 2,5 con 12 M HCl.

3.6.3. Purificación del anticuerpo secundario Anti-rabbit

En estudios previos, se observó reactividad del anticuerpo secundario comercial con proteínas de levadura, las cuales dan señales falsas de reacción, debido a que el anticuerpo secundario debe unirse únicamente a la fracción constante IgG de los anticuerpos primarios usados (Anti-RPS6 y Anti RPS6-P). Por ello, fue necesario la purificación de dicho anticuerpo secundario, ya que suelen ser fabricados para su uso con células mamíferas y en *S. cerevisiae* presentan uniones inespecíficas. Para ello, se cargó un gel con saturación de muestra de proteínas de levadura, se realizó la transferencia a membrana y se incubó en ella durante 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario comercial Anti-rabbit con una dilución 1:100 en BSA. Después, se recogió y se realizó una dilución 1:50 para su posterior uso.

3.6.4. Inmunoblot

Tras realizar el Western blot, la membrana se incubaba con la solución de bloqueo durante 1 h, cambiando el medio a los 30 min, con el fin de bloquear todos los posibles sitios de unión específica.

A continuación, se incuba con el anticuerpo primario RPS6-P durante toda la noche a 4°C en agitación. Dicho anticuerpo se usa con una dilución de 1:300 en solución de bloqueo.

Seguidamente, se lava la membrana en 3 series de 10 min con TBS-T para eliminar el anticuerpo que no se ha unido y restos de impurezas. Después, se añade el anticuerpo secundario Anti-rabbit previamente purificado y se incuba en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se repiten los 3 lavados de 10 min con TBS-T.

Finalmente, se realiza la detección por quimioluminiscencia (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) y se toman imágenes con sistema LAS-3000 (FUJI).

Los dos anticuerpos primarios usados (Anti-RPS6 y Anti-RPS6-P) se probaron en la misma membrana, con el fin de reducir errores de experimentación. Para ello, la membrana se incuba en solución de *stripping* durante 15 min en agitación tras el primer revelado. Se lava con la solución de lavado, se bloquea y se vuelve a incubar con el anticuerpo deseado como se ha descrito anteriormente. Primero se usó el anticuerpo primario Anti-RPS6-P debido a que es menos potente.

3.7. Control de carga

Aunque vamos a llevar un control interno en cada carril con la cantidad de proteína RPS6 total (fosforilada y no fosforilada), resulta necesario ajustar al máximo las cantidades de proteína cargada en los pocillos de electroforesis para evitar correcciones excesivas.

3.7.1. Método del papel

Este método sirve para realizar una cuantificación de proteína bastante exacto, pero se trata de un proceso muy laborioso ya que hay que eliminar el detergente SDS tras fijar la proteína a un filtro. Partiendo de un trozo de papel de filtro Whatman 3MM de 5 m², se marca una cuadrícula de 0.5 cm² aproximadamente. En el centro de cada cuadrado se aplican 6 µL de cada muestra, dejando secar al aire durante 10-15 min. Seguidamente se sumerge el papel en metanol durante 30 s para eliminar el SDS, que reaccionaría con el reactivo de Bradford. A continuación, se realiza la tinción con 200 mL del reactivo Bradford (Coomassie brilliant blue G en 7% de ácido fosfórico) durante 30 min en el balancín. Después, se lava con ácido acético 7 % durante 1 h y 15 min (máximo 3 hs). Tras dejar secar el papel, se corta cada cuadrado y se introduce en un eppendorf (1.5 mL) con 1 mL de tampón de extracción

(66 % metanol, 33 % H₂O miliQ y 1 % NH₄OH). Se agita cada eppendorf durante 5 min y se leen las muestras a una absorbancia de 610 nm (Minamide y Bamburg, 1990).

3.7.2. Método de las absorbancias

Se realizó un ajuste de los volúmenes a cargar en los geles en función de las absorbancias tras 4h de cultivo. Puesto que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de levadura, se calculó el volumen de cada muestra mediante la relación: $C \cdot V = C' \cdot V'$, siendo C' el valor de la menor absorbancia, V' el mayor volumen a aplicar (en nuestro caso fue 14 μ L), C el valor de la absorbancia de una determinada muestra y V el volumen para aplicar de la determinada muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de los ácidos débiles sobre el crecimiento de la cepa de levadura BY4741

En primer lugar, se pretende determinar la concentración óptima de los ácidos sórbico y propiónico para inhibir el crecimiento de células de levadura en fase exponencial (absorbancia alrededor de 0.8). El efecto del ácido sórbico en el crecimiento de la cepa se muestra en la Figura 9.

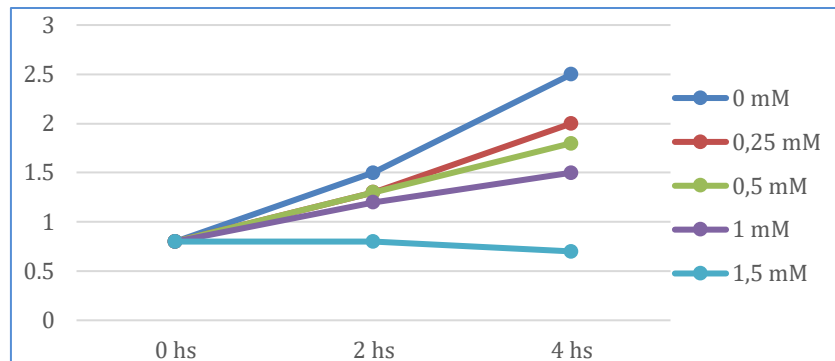


Figura 9. Absorbancias de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 tras añadir distintas concentraciones de ácido sórbico a tiempo cero.

La concentración seleccionada para la realización del estudio fue 1 mM, debido a que presenta una absorbancia próxima a la mitad de absorbancia del cultivo control (0 mM) tras las 4 horas de incubación (Figura 9). Dicha concentración no inhibe completamente el crecimiento, pero la siguiente concentración parece excesiva por inhibir ya a las 2 h. Dichas concentraciones fueron probadas con el ácido propiónico pero no se observó inhibición, por ello se realizó una prueba con concentraciones más elevadas que se muestran en la Figura 10.

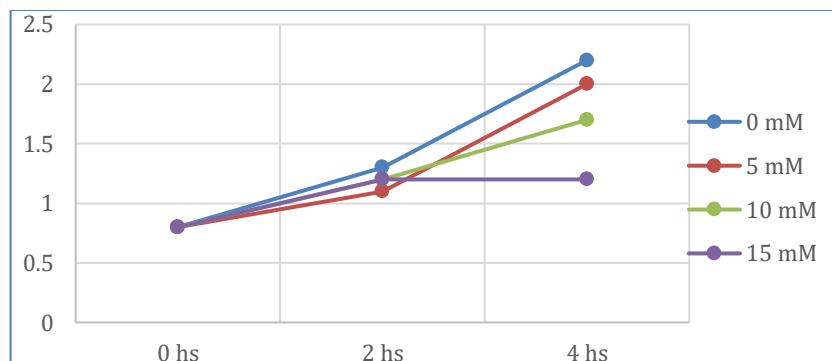


Figura 10. Absorbancias de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 a distintas concentraciones del ácido propiónico añadidas al tiempo cero.

La concentración seleccionada para realizar el estudio con el ácido propiónico fue 15 mM, ya que como podemos observar, presenta una absorbancia similar a la mitad de la absorbancia del cultivo control (0 mM) tras 4 hs de incubación y no inhibe apenas a las 2 h.

4.2. Control de carga

4.2.1. Método del papel

Debido a la diferencia de absorbancias de los cultivos que se realizan en este trabajo, necesarios para observar la acción de los ácidos débiles usados, se realiza una cuantificación de proteína de las distintas muestras para cargar los geles con la cantidad correspondiente, con el fin de tener membranas con la misma concentración de muestra y, así, poder comparar la intensidad de las bandas de cada carril.

Tabla 1. Tabla de absorbancias a 610 mn de las muestras. La primera columna son el número de cultivos realizados (4 repeticiones) de cada cual se realizó 3 medidas de absorbancias (3 réplicas); la segunda columna son los valores de las absorbancias de los cultivos control; la tercera columna son los valores de las absorbancias de los cultivos tratados con ácido sórbico; la cuarta columna son los valores de las absorbancias de los cultivos tratados con ácido propiónico. De cada réplica tenemos la media de las 3 absorbancias medidas.

Réplicas	Control	Ácido sórbico	Ácido propiónico
1	0,877	0,580	0,532
1	0,840	0,560	0,535
1	0,860	0,580	0,562
media (1)	0,859	0,573	0,543
2	1,105	0,586	0,603
2	0,679	0,614	0,627
2	1,081	0,550	0,661
media (2)	1,093	0,583	0,630
3	1,099	0,720	0,815
3	1,100	0,706	0,798
3	1,312	0,734	0,702
media (3)	1,170	0,720	0,772
4	1,310	1,057	0,976
4	1,170	0,755	1,110
4	1,291	0,970	1,018
media (4)	1,257	0,927	1,035

A partir de la tabla 1, se pudo calcular el volumen de carga en el gel de cada muestra. Realizando el cálculo de la Figura 11 se pudo obtener los resultados de la tabla 2, los cuales se cargaron en el gel y

se obtuvieron los resultados que observamos en la Figura 12, tomando como referencia 15 μL como el máximo volumen a cargar, que corresponderá al mínimo valor de absorbancia (marcado en amarillo en la tabla 1).

$$V = \frac{Abs}{Abs(m)}$$

Figura 11. Ecuación realizada para la obtención del volumen de cada muestra a cargar en el gel. Donde V es el volumen en μL ; Abs es el valor de la absorbancia de cada muestra y $Abs(m)$ es el valor de la absorbancia mínima correspondiente a la muestra tratada con ácido propiónico de la primera réplica (P1).

Tabla 2. Volúmenes de muestra a cargar en función del cálculo de la Figura 11. En la primera columna se encuentran las muestras y en la segunda columna el volumen de cada una de ellas a cargar en el gel calculado mediante la operación de la Figura 11. En amarillo se encuentra la muestra tratada con ácido propiónico de la repetición 1 (P1) debido a que se toma como referencia. P1 presenta la mínima absorbancia (como se ve en la tabla 1), por lo que es la muestra que presenta el mayor volumen a cargar (15 μL).

Muestras	Volumen (μL)
W1	9,5
S1	14,2
P1	15,0
W2	7,5
S2	14,0
P2	12,9
W3	7,0
S3	11,3
P3	10,6
W4	6,5
S4	8,8
P4	7,9

Tras obtener los resultados que vemos en la tabla 2, se cargaron dichos volúmenes en el gel y se obtuvo los resultados que se ven en la Figura 12.

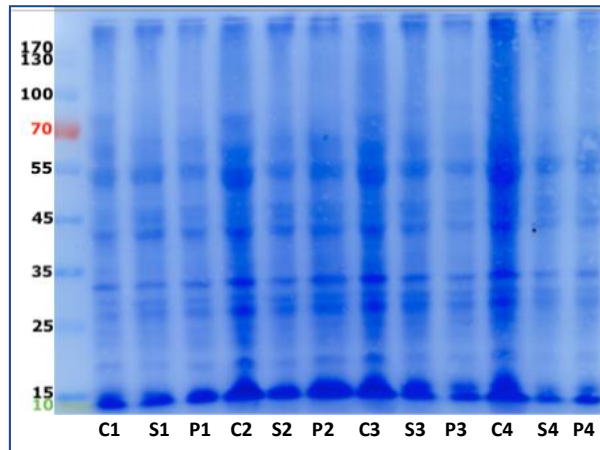


Figura 12. Membrana cargada con las cantidades calculadas mediante el método del papel. De los 13 carriles que se observan, el primero corresponde con el patrón, seguido de 4 repeticiones de: cultivo control (C), cultivo tratado con ácido sórbico (S) y cultivo tratado con ácido propiónico (P).

Como vemos en la Figura 12, no obtuvimos los resultados deseados pese a seguir el protocolo de la cuantificación de proteína mediante el método del papel y haber cargado en función de dichos resultados. Se observan claras diferencias entre varios carriles, estando las muestras C2, C3 y C4 bastante saturados, además de los carriles de las muestras S2, P2 y S3. Aparentemente este método complicado no es suficientemente preciso en nuestras manos. Por ello, se pasó a realizar la cuantificación de proteína mediante el método de ajustar el producto de las absorbancias de los cultivos y los volúmenes utilizados para preparar el extracto de proteínas.

4.2.2. Control de carga mediante el método de las absorbancias y volúmenes

En la tabla 3 tenemos los valores de las absorbancias de los cultivos tras 4h de incubación siendo la de la muestra P2 la de menor valor (1.2). La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de levadura. Por ello, mediante la fórmula de la Figura 13 se puede obtener el volumen correspondiente de cada muestra. Como se quiere tener el mismo número de moles ($n=C \times V$) se toma como valores fijos C y V , correspondientes al valor de la absorbancia mínima (1.2) y el valor del máximo volumen a aplicar (14 μ L), respectivamente. Cambiando el valor de C' por el de la absorbancia de cada muestra obtendremos el valor del volumen (V') a aplicar de cada muestra.

$$C \times V = C' \times V'$$

Figura 13. Fórmula para calcular el volumen a aplicar de cada muestra. Donde el número de moles se mantiene constante ($n= C \times V$), C y V son valores constantes y correspondientes al valor de la mínima absorbancia y el valor del volumen máximo, respectivamente. C' corresponderá al valor de la absorbancia de cada muestra y V' al volumen a aplicar de cada una de ellas.

Tabla 3. Tabla de volúmenes a cargar en función de las absorbancias. La primera columna corresponde a las muestras, la segunda al valor de las absorbancias tras 4h de incubación y la tercera columna al volumen a cargar en el gel de cada muestra calculado mediante la fórmula de la Figura 13. El significado de las muestras se indica en la leyenda de la Figura 14.

Muestras	Abs	V'
C1	3,5	4,8
S1	2	8,4
P1	1,5	11,2
C2	2,4	7,0
S2	1,7	9,9
P2	1,2	14,0
C3	2,8	6,0
S3	1,7	9,9
P3	1,8	9,3
C4	2,7	6,2
S4	1,7	9,9
P4	1,5	11,2

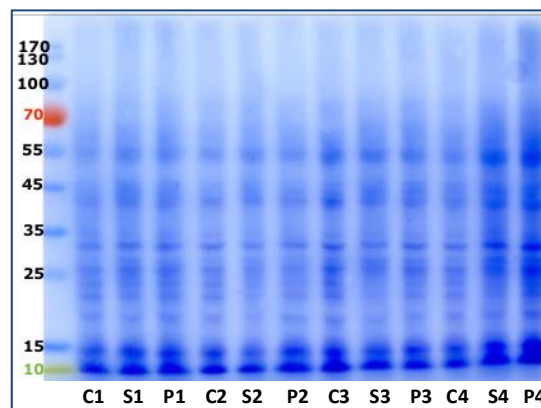


Figura 14. Membrana cargada con las cantidades calculadas mediante el método basado en las absorbancias. De los 13 carriles que se observan, el primero corresponde con el patrón (pesos moleculares en kDa), seguido de 4 repeticiones de: cultivo control (C), cultivo tratado con ácido sórbico (S) y cultivo tratado con ácido propiónico (P).

A diferencia de la membrana cargada con las cantidades calculadas mediante el método del papel, en la Figura 14 vemos que los carriles se encuentran bastante más igualados entre ellos, dentro de cada experimento de tres condiciones (C, S y P), exceptuando los carriles de las muestras C3, S4 y P4.

4.3. Revelado de los Western blots de la proteína RPS6

Por estudios previos de nuestro laboratorio, se sabía que el segundo anticuerpo contra IgG de conejo se había purificado por la casa comercial solamente eliminando IgG que reaccionasen contra proteínas de mamíferos. Este segundo anticuerpo daba reacción inespecífica contra proteínas de

levadura (él solo, sin anticuerpo primario) y por tanto había que quitar esa reactividad por absorción contra proteínas de levadura.

4.3.1. Revelado de membranas tras la primera purificación del segundo anticuerpo

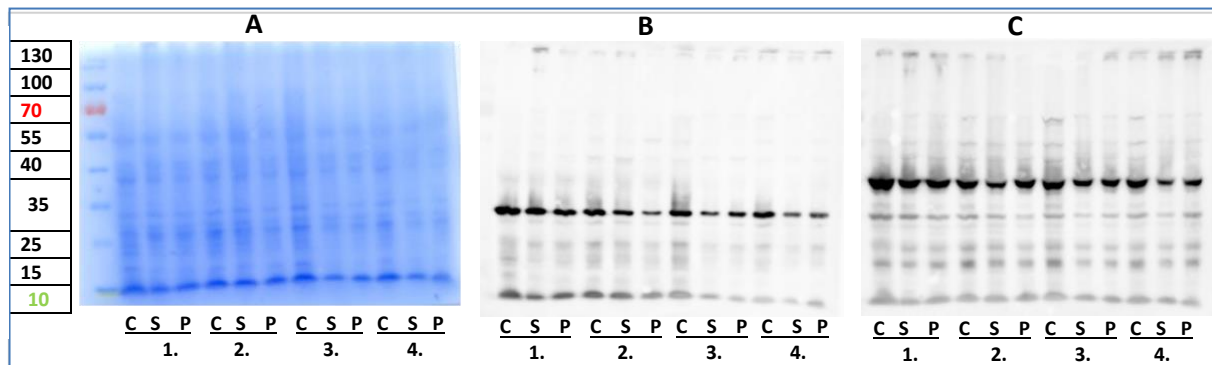


Figura 15. Gel teñido con Commassie blue (A); membrana tratada con el anticuerpo primario Anti-RPS6-P (B); membrana tratada con anticuerpo primario Anti-RPS6 (C). Membranas tras la primera purificación del anticuerpo secundario. A la izquierda se encuentra el peso molecular correspondiente a cada banda de los patrones. Los carriles, de izquierda a derecha, son de cuatro repeticiones de la siguiente serie: muestra control (C), muestra con ácido sórbico (S) y muestra con ácido propiónico (P).

Tras la primera purificación del segundo anticuerpo realizada mediante el uso de una membrana cargada de proteínas de levadura, se observan varias bandas, pero claramente hay una mayoritaria en B y en C que debe corresponder a la reacción específica (Figura 15). Curiosamente en la reacción con anticuerpo primario contra RPS6 total hay una segunda banda más débil que coincide en su posición con la banda fuerte en la reacción con el anticuerpo específico de la forma fosforilada de RPS6, que parece migrar más rápidamente (comparar B y C).

Se procedió a realizar una segunda purificación del anticuerpo secundario mediante una membrana sobrecargada de proteínas, es decir, cargando un gel con aproximadamente 40 μ L de cada muestra en cada pocillo y llevando a cabo su posterior transferencia.

4.3.2. Revelado de membranas tras la segunda purificación del segundo anticuerpo

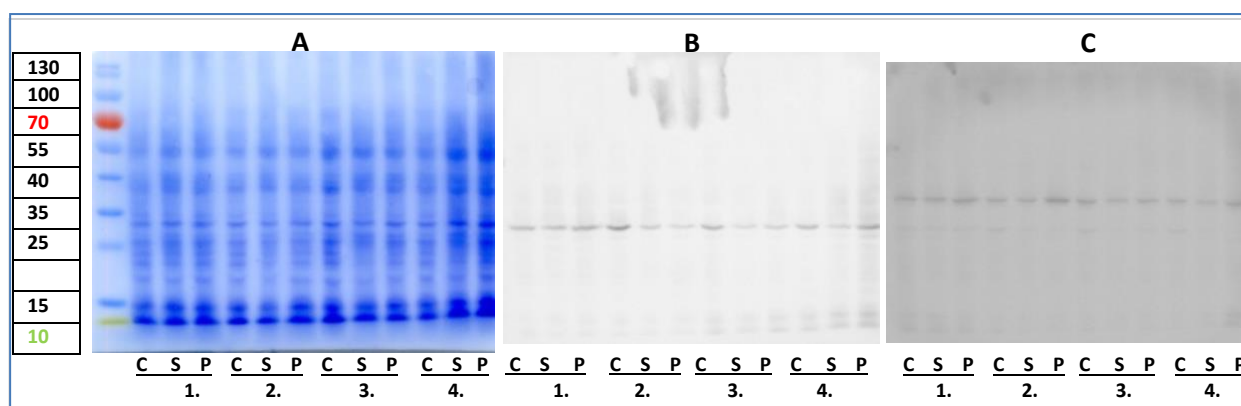


Figura 16. Gel teñido con **Commasie blue (A)**; membrana tratada con el anticuerpo primario **Anti-RPS6-P (B)**; membrana tratada con anticuerpo primario **Anti-RPS6 (C)**. Membranas tras la segunda purificación del anticuerpo secundario. A la izquierda se encuentra el peso molecular correspondiente a cada banda de los patrones. Los carriles, de izquierda a derecha, son de cuatro repeticiones de la siguiente serie: muestra control, muestra con ácido sórbico y muestra con ácido propiónico.

Observando los resultados de la Figura 16, en comparación con la Figura 15, se ve que el segundo anticuerpo ha perdido actividad pero que se obtienen resultados muy similares: una banda mayoritaria en cada caso y que en B migra por delante que en C.

En la Figura 17 se amplía el resultado de las repeticiones 2 y 3 en B y en C, donde se observa una caída significativa de la forma fosforilada tras el tratamiento con ácidos, con carga de RPS6 total similar o incluso algo mayor tras el tratamiento.

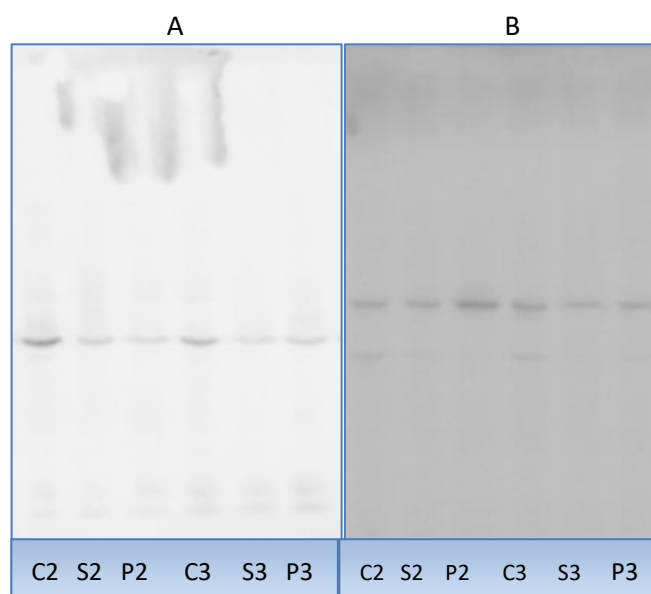


Figura 17. Adaptación de la Figura 16B (A) y adaptación de la Figura 16C (B), recortando las réplicas 2 y 3. Los carriles de izquierda a derecha van en el orden: control, cultivo tratado con ácido sórbico y cultivo tratado con ácido propiónico.

Además, en la Figura 17B, vemos en dos réplicas el mismo patrón: la banda correspondiente a los cultivos no tratados (C2 y C3) se encuentra bastante más marcada que las bandas correspondientes a los cultivos tratados con los ácidos (S2, P2, S3 y P3).

4.3.3. Análisis de áreas de las bandas de las membranas

Se realizó el análisis de las áreas de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y no fosforilada, tanto en la membrana tratada con el anticuerpo para RPS6 total (Figura 18) como en la membrana tratada con el anticuerpo específico de RPS6 fosforilada (Figura 19). Dichas Figuras muestran el valor medio de las áreas de las muestras, agrupando los controles de las 4 réplicas en la muestra general control (C), las cuatro réplicas de la muestra tratada con ácido sórbico en la muestra general sórbico (S) y las 4 réplicas de la muestra tratada con ácido propiónico en la muestra general propiónico (P).

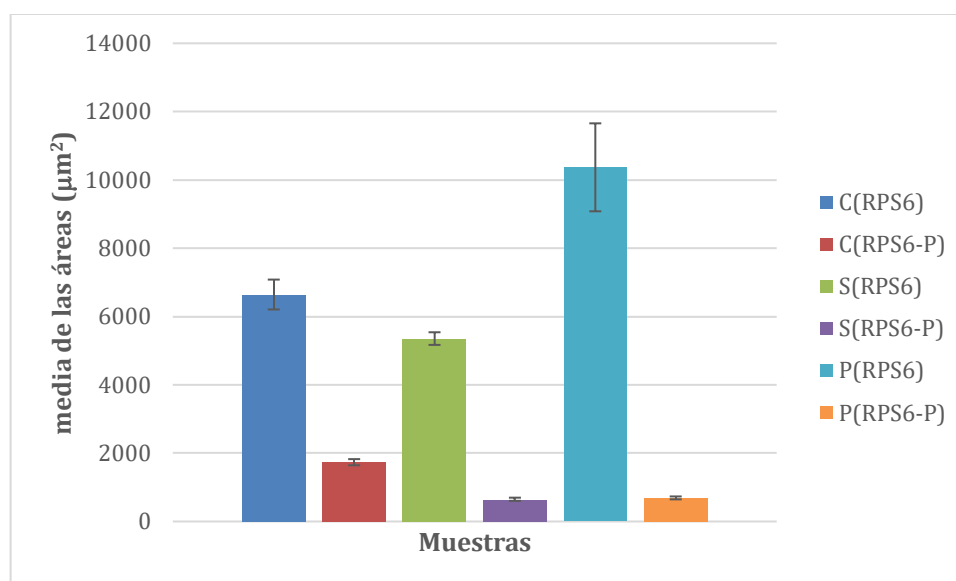


Figura 18. Análisis de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo primario Anti-RPS6. Dicha membrana presenta dos bandas por cada carril, correspondientes tentativamente a la proteína RPS6 y a la proteína RPS6 fosforilada en orden creciente de movilidad. Las columnas corresponden al valor medio tras realizar 3 medidas de todas las áreas (agrupando las 4 repeticiones del WT, las 4 del ácido sórbico y las 4 del ácido propiónico) mediante el uso del programa ImageJ-wi64. Además, se presenta en cada una de ellas la barra de error estándar.

Este mismo resultado se obtiene utilizando las 4 repeticiones y corrigiendo la carga desigual de los pocillos mediante el cociente de las áreas de las bandas correspondientes (tentativamente) a las formas fosforiladas y no fosforiladas de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo Anti-RPS6 (Tabla 4).

Tabla 4. Cociente de las áreas de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y de las áreas de las bandas de RPS6 total. En columnas se encuentran las distintas muestras: control, sórbico y propiónico. En filas se encuentra el cociente realizado entre las medias de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y la RPS6 total de las distintas muestras, valores que se encuentran en la Figura 18. En la segunda fila se encuentra el porcentaje de la fosforilación de la RPS6, tomando como referencia el cociente de RP6-P/RPS6 del control (100%).

	Control	Sórbico	Propiónico
Cociente de áreas RPS6-P/RPS6 total	$\frac{1735.34}{6645.48} = 0.26$	$\frac{650.93}{5355.27} = 0.12$	$\frac{690.44}{10369.19} = 0.07$
%	100	46	25

Por otra parte, se realizó una prueba estadística (*t-student*) con los valores de las medias de las áreas, enfrentando uno a uno todas las muestras: control(C) - sórbico(S), control (C) - propiónico (P), sórbico (S) - propiónico (P), control (C) - control fosforilado (C(P)), control fosforilado (C(P))- sórbico fosforilado (S(P)), control fosforilado (C(P))-propiónico fosforilado (P(P)) y sórbico fosforilado (S(P)) -propiónico fosforilado (P(P)). Las pruebas C - S, C(P) – S(P) y C(P) – P(P) resultaron estadísticamente significativas, con un valor de la t de student por debajo del p-value (< 0.05) cuyo valor podemos observar en la tabla 5, marcado con asterisco los que fueron estadísticamente significativos.

Tabla 5. Análisis estadístico de las áreas de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo Anti-RPS6. Prueba de *t de student* comparando los valores de las medias de las áreas de las bandas entre las distintas muestras. La primera columna corresponde a las relaciones de las muestras (qué muestra fue comparada con qué muestra) y la columna de la derecha corresponde a los valores de las *t de student*. En asterisco se muestran las que resultaron estadísticamente significativas, con un valor menor del p- value (< 0.05).

Relación entre las muestras	Prueba t de student
C - S	0,015 *
C - P	0,227
S - P	0,052
C (P) - S(P)	0,000 *
C (P) - P (P)	0,000 *
S (P) - P (P)	0,542

Como ya se ha dicho anteriormente, se realizó el mismo estudio de las áreas en la membrana tratada con el anticuerpo primario RPS6-P. En la Figura 19 se encuentra el valor medio de las áreas de las distintas muestras que, en este caso, se trata de tres: proteína fosforilada del cultivo control (C), del cultivo tratado con ácido sórbico (S) y del cultivo tratado con el ácido propiónico (P).

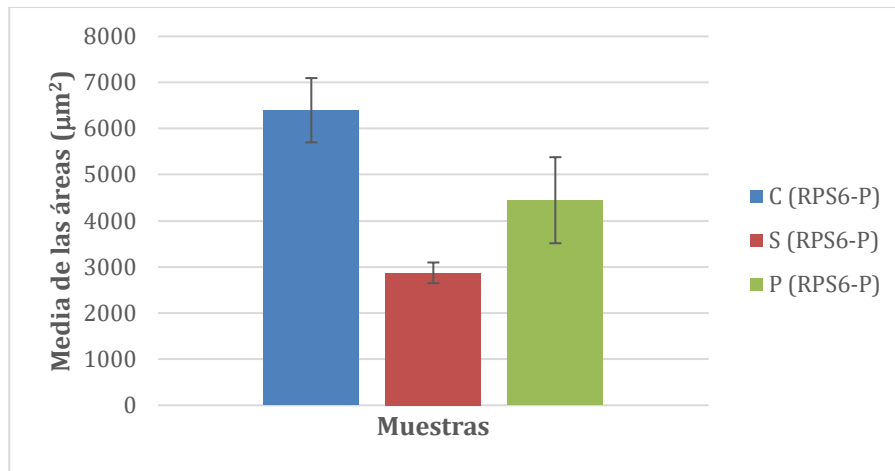


Figura 19. Análisis de las bandas de la membrana trata con el anticuerpo primario Anti-RPS6-P. Dicha membrana presenta una banda por cada carril correspondiente a la proteína RPS6 fosforilada. Las columnas corresponden al valor medio tras realizar 3 medidas de todas las áreas (agrupando las 4 repeticiones del cultivo control (C), las 4 del ácido sórbico (S) y las 4 del ácido propiónico (P) mediante el uso del programalmageJ-wi64. Además, se presenta en cada una de ellas la barra de error estándar.

Como se puede ver en la Figura 16B, se obtuvo una mayor resolución de la banda de la proteína RPS6 fosforilada en la membrana tratada con el anticuerpo primario específico para esta, en comparación con la Figura 16C. Por ello, a fin de obtener unos resultados más consistentes, se realizó el cociente de las medias de las áreas de la proteína RPS6 fosforilada de dicha membrana entre las medias de las áreas de la proteína RPS6 no fosforilada de la membrana tratada con el anticuerpo primario para RPS6 total. Los resultados que se observan en la tabla 5 son relativamente similares a los obtenidos en la tabla 4. En ambos vemos una disminución de la fosforilación en la proteína RPS6 en los cultivos tratados con ácidos de aproximadamente un 50%.

Tabla 6. Cociente de las áreas de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y de las áreas de las bandas de RPS6 total. En columnas se encuentran las distintas muestras: control, sórbico y propiónico. En filas se encuentra el cociente realizado entre las áreas de las bandas de la proteína RPS6 fosforilada y la RPS6 total, de las distintas muestras. En la segunda fila se encuentra el porcentaje de la fosforilación de la RPS6, tomando como referencia el cociente de RP6-P/RPS6 del control (100%).

	Control	Sórbico	Propiónico
Cociente de áreas RPS6-P/RPS6 total	$\frac{6398.11}{6645,48} = 0.96$	$\frac{2872.6}{5355.27} = 0.54$	$\frac{4446.99}{10369.19} = 0.43$
%	100	56	45

Por último, también se realizó el análisis estadístico (*t-student*) de los valores de las medias de las áreas de la membrana tratada con el anticuerpo específico para la proteína RPS6 fosforilada. Como se

observa en la tabla 7, la relación control-sórbico fue estadísticamente significativa (asterisco) con un valor de la *t de student* incluso menor que el que ha visto en la tabla 5 ($p\text{-value} < 0.01$).

Tabla 7. Análisis estadístico de las áreas de las bandas de la membrana tratada con el anticuerpo Anti-RPS6-P. Prueba de *t de student* comparando los valores de las medias de las áreas de las bandas entre las distintas muestras. La primera columna corresponde a las relaciones de las muestras (qué muestra fue comparada con qué muestra) y la columna de la derecha corresponde a los valores de las *t de student*. En asterisco se muestran las que resultaron estadísticamente significativas, con un valor menor del $p\text{-value}$ (< 0.05).

Relación entre las muestras	Prueba <i>t de student</i>
C - S	0,000 *
S - P	0.099
C - P	0.099

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de los ácidos sórbico y propiónico

El principal problema para el estudio del efecto de los ácidos sórbico y propiónico sobre el estado de fosforilación de RPS6 es la inevitable desigualdad de carga de proteína entre las distintas muestras analizadas por electroforesis e inmunodetección. Tras intentar resolverlo igualando la cantidad de células extraídas por pocillo, tenemos que en 2 de las 4 repeticiones se consigue igualdad de carga y se puede concluir a simple vista que el tratamiento con ácidos disminuye la fosforilación de RPS6 medida con anticuerpo específico contra la forma fosforilada, probablemente porque acidifican el interior de las células e inhiben TORC1. Ahora bien, utilizando el anticuerpo contra la proteína RPS6, fosforilada o no, se detectan dos bandas: una más débil con la misma movilidad que la detectada con el anticuerpo contra la forma fosforilada y otra más intensa de menor movilidad. Asumiendo que las dos bandas son específicas tenemos que proponer que la fosforilación aumenta la movilidad electroforética de RPS6 y que la forma fosforilada es menos abundante que la no fosforilada. Con estas premisas podemos utilizar las 4 repeticiones, incluyendo las 2 con diferencias de carga, porque la señal con el anticuerpo contra las dos formas de RPS6 nos sirve de control interno de cada muestra utilizando el cociente de la señal con anticuerpo contra la forma fosforilada y la señal con el anticuerpo contra las dos formas. Haciendo esto las 4 repeticiones del experimento dan una diferencia considerable entre muestras control y muestras tratadas con ácidos, siendo el nivel de fosforilación de estas últimas 35-51 % de las primeras.

Hay que hacer una advertencia importante: no hemos demostrado que la fosforilación aumente la movilidad de RPS6. Ello requeriría tratar las muestras con fosfatasa alcalina y ver que cambia su movilidad. Sin embargo, el hecho de que los dos anticuerpos reconocen mayoritariamente dos bandas con distinta movilidad apoya fuertemente nuestra hipótesis, aunque tenemos que hacer aún el experimento del tratamiento con fosfatasa. En todo caso, la proteína RPS6 tiene un punto isoeléctrico muy alto (11,1) lo que significa que tiene una gran cantidad de cargas positivas de amino ácidos y por tanto su movilidad electroforética, incluso en presencia de SDS para enmascarar la carga intrínseca, es menor de lo esperado por su peso molecular (27 kDa).

5.2. Efecto de la acidificación en la ruta de TOR

Partiendo de lo estudiado en la literatura, se sabe que, tanto la presencia de nutrientes (aminoácidos), ciertos factores de crecimiento como un pH_i básico (alto) activan la ruta de señalización de la kinasa serina/treonina TORC1 mediante la fosforilación de la subunidad S6K (Sch9 en y Ypk3 S. *cerevisiae*) que da como resultado el aumento de crecimiento celular (Figura 20).

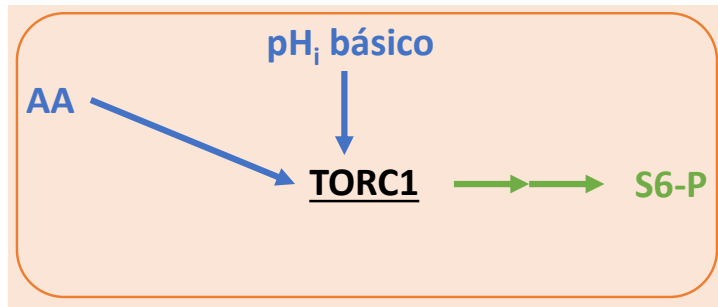


Figura 20. Resumen de las rutas de activación e inhibición de la proteína kinasa TORC1.

La hipótesis propuesta en este trabajo se muestra en la Figura 21, donde un descenso del pH_i provoca una inhibición en la fosforilación de la proteína S6 (Sch9 en *S. cerevisiae*) debido a una inactivación de la proteína TORC1 en el sistema de levaduras. Dicha hipótesis la hemos demostrado mediante el análisis de la fosforilación de la proteína S6 en distintos cultivos tratados con el ácido sórbico y el ácido propiónico.

Con el empleo de la técnica de inmunodetección y su posterior revelado, hemos detectado una notable diferencia entre los distintos cultivos, donde los que fueron tratados con los ácidos dichos anteriormente presentaban menos cantidad de la proteína S6 fosforilada, a diferencia de los cultivos control.

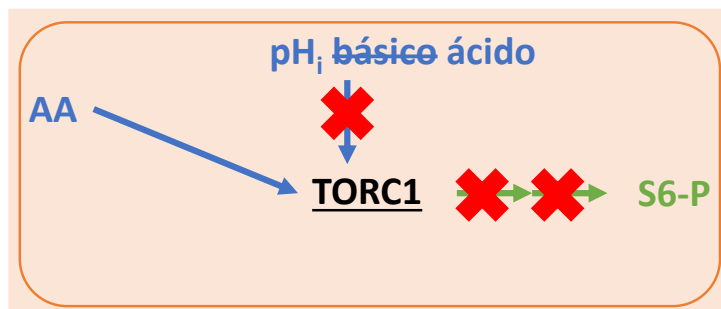


Figura 21. Esquema de la hipótesis de este trabajo.

En cuanto a las condiciones fisiológicas de las células normales, se sabe que existe una diferencia de pH_i y pH_e siendo de 7 y 7.4, respectivamente. En cambio, en las células cancerosas hay una variación de estos valores siendo el pH_i alrededor de 7.4 y un pH_e de 6.9.

Por otra parte, en el apartado de TOR de la introducción, podemos observar el grado de conservación de esta proteína, de manera que podemos extrapolar estos resultados realizados en levaduras a eucariotas superiores como el ser humano.

Hasta el momento, la rapamicina que es un inhibidor de TOR se ha usado como inmunosupresor y como inhibidor de células cancerosas y, teniendo en cuenta los datos nombrados anteriormente, en este trabajo hemos propuesto la siguiente hipótesis. Sabiendo que el pH_i básico activa a la proteína TOR y en consecuencia un aumento en el crecimiento celular, hemos tratado cepas de *S. cerevisiae* con ácidos débiles tales como el ácido propiónico y el ácido sórbico para intentar llegar al proceso contrario, es decir, disminuir el pH_i para inhibir a la proteína TOR y, con ello, el crecimiento celular.

Como podemos observar en los resultados del Western, encontramos diferencias entre las bandas de los cultivos controles (C1 y C2) y las bandas de los cultivos tratados con el ácido sórbico y el ácido propiónico (S1, S2, P1 y P2).

Teniendo en cuenta la literatura, la proteína S6 humana de la subunidad pequeña del ribosoma es fosforilada en 5 residuos de Serina (Ser235/236/240/244/247) por la kinasa S6k, previamente habiendo sido activada por la fosforilación mediada por mTORC1. En cambio, en levaduras existen 2 posibles sitios de fosforilación de la Rps6 de levadura (Ser232 y Ser233, que corresponden con Ser235 y Ser236 en humanos) por parte de la Sch9 o Ypk3, previamente activada por la fosforilación de TORC1.

6. CONCLUSIÓN

Los objetivos del presente trabajo eran:

1. Determinar las concentraciones de los ácidos sórbico y propiónico que inhiben parcialmente el crecimiento de levadura en fase exponencial.
2. Determinar mediante detección con anticuerpos específicos la cantidad de proteína ribosomal RPS6 total y fosforilada en cultivos control y tratados con ácidos sórbico y propiónico para estimar la actividad de TORC1 e intentar obtener evidencia preliminar de que TORC1 se inhibe al acidificar el interior de las células.

Las conclusiones principales son:

1. Las concentraciones de los ácidos sórbico y propiónico seleccionadas para acidificar el interior de las células e inhibir el crecimiento y TORC1 son 1 y 15 mM respectivamente, en un medio YPDA tamponado a pH 4,0.
2. Utilizando el cociente entre las áreas de las bandas tentativamente asignadas a RPS6 fosforilado y RPS6 total, en 4 repeticiones del experimento resulta estadísticamente significativo que los dos ácidos empleados hagan caer la fosforilación de RPS6 entre 2 y 3 veces, lo que significa una gran inhibición de la ruta TORC1 por la acidificación intracelular.

7. BIBLIOGRAFÍA

ADVANSTA CORPORATION, (2011). *Ecogen*, visto el 28 de junio de 2018
<http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf>

ARTES BLANCAS (2009). *Noticias relacionadas con los sectores de las artes blancas*, visto el 10 de abril de 2018

<http://www.artesblancas.com/la-levadura-saccharomyces-cerevisiae/>

CONG, W. T., HWANG, S. Y., JIN, L. T., & CHOI, J. K. (2009). Detection of proteins on blots using Direct Blue 71. In *The Protein Protocols Handbook* (pp. 729-735). Humana Press, Totowa, NJ.

FINGAR, D. C., & BLENIS, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23(18), 3151.

GAUBITZ, C., PROUTEAU, M., KUSMIDER, B., & LOEWITH, R. (2016). TORC2 structure and function. *Trends in biochemical sciences*, 41(6), 532-545.

GONZÁLEZ, A., SHIMOBAYASHI, M., EISENBERG, T., MERLE, D. A., PENDL, T., HALL, M. N., & MOUSTAFA, T. (2015). TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 10(3), e0120250.

LIM, S., & KALDIS, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.

MORGAN, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1), 261-291.

HUBBARD, M.J., & COHEN, P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in biochemical sciences*, 18(5), 172-177.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.

LOEWITH, R., & HALL, M. N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 189(4), 1177-1201.

MADSHUS, I.H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochemical journal*, 250(1),

MANNING, G., WHYTE, D.B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., & SUDARSANAM, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934.

MINAMIDE, L. S., & BAMBURG, J. R. (1990). A filter paper dye-binding assay for quantitative determination of protein without interference from reducing agents or detergents. *Analytical biochemistry*, 190(1), 66-70.

NUCCITELLI, R., & DEAMER, D.W. (1982). *Intracellular PH: Its Measurement, Regulation, and Utilization in Cellular Functions: Proceedings of a Conference Held at the Kroc Foundation, Santa Ynez Valley, California, July 20-24, 1981*. Alan R. Liss.

PARKS, S.K., CHICHE, J., & POUYSSÉGUR, J. (2013). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(9), 611.

PERONA, R., & SERRANO, R. (1988). Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature*, 334(6181), 438.

RESHKIN, S.J., GRECO, M.R., & CARDONE, R.A. (2014). Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1638), 20130100.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.

WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., & HALL, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484.

YERLIKAYA, S., MEUSBURGER, M., KUMARI, R., HUBER, A., ANRATHER, D., COSTANZO, M., ... & LOEWITH, R. (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 27(2), 397-409.