

# ÍNDICE

	página
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1. Terapia inmunosupresora. FK506</b>	5
<b>2. Levadura como sistema modelo</b>	9
<b>3. Ruta de control traduccional</b>	11
Control traduccional y serina-treonina fosfatasas	16
Control traduccional en mamíferos	17
<b>4. Ruta de respuesta a estrés osmótico</b>	19
Respuesta a estrés osmótico en mamíferos	23
<b>5. Diabetes</b>	26
p38 y diabetes	30
Control traduccional y diabetes	30
Fosfatasas y diabetes	31
<b>6. Tungstato</b>	33
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>1. Cultivo y manipulación celular</b>	43
1.1 Bacterias	43
1.2 Levaduras	43
1.3 Mamíferos	47
<b>2. Técnicas de transferencia génica</b>	48
2.1 Preparación de células competentes de bacteria	48
2.2 Transformación en bacterias	49
2.3 Transformación en levadura	49
<b>3. Obtención de extractos proteicos</b>	54
3.1 Extractos proteicos de levadura para transferencia a membrana	54

3.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST	54
3.3 Extracción de proteínas de células humanas	55
<b>4. Ensayos enzimáticos</b>	<b>56</b>
4.1 Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa en levaduras	56
4.2 Ensayos de actividad fosfatasa con pNPP	57
<b>5. Electroforesis y técnicas de detección de proteínas</b>	<b>58</b>
5.1 Electroforesis de proteínas	58
5.2 Transferencia a membrana	58
5.3 Tinción de geles con Coomassie Blue	59
5.4 Tinción de geles con Ponceau S	59
5.5 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana	59
<b>6. Análisis de citometría de flujo</b>	<b>61</b>
<b>7. Análisis HPLC de iones</b>	<b>62</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>63</b>
<b>1. Caracterización de los efectos de FK506 en levadura</b>	<b>65</b>
1.1 FK506 produce sensibilidad a estrés osmótico en levadura de un modo independiente de calcineurina y las proteínas de unión a FK506	65
1.2 La prototrofia a triptófano o el exceso de triptófano rescatan la sensibilidad a estrés osmótico inducida por FK506 en levadura	67
1.3 El ayuno de triptófano inducido por FK506 activa la ruta de Control Traduccional (GCN)	69
1.3 La interrupción de la ruta GCN disminuye la sensibilidad osmótica inducida por FK506	71
<b>2. Estudio de la interacción entre las rutas HOG y GCN</b>	<b>73</b>
2.1 FK506 refuerza, vía Gcn2p, la fosforilación de Hog1p en condiciones de estrés osmótico	73
2.2 Implicación de las fosfatasas de Hog1p en los efectos de FK506 sobre la respuesta a estrés osmótico	76

2.3 La sensibilidad del mutante $\Delta gcn2$ a FK506 se debe al ayuno de aminoácidos y no a la expresión dependiente de Gcn4p.	77
2.4 Hog1p regula la activación de Gcn2p inducida por FK506	79
<b>3. Validación de los efectos de FK506 en células de mamífero</b>	<b>81</b>
3.1 FK506, pero no CsA, inhibe la activación de la SAPK p38 por estrés osmótico en células de mamífero	81
3.2 La disponibilidad de aminoácidos, y triptófano en particular, mitiga el efecto negativo de FK506 sobre la activación de p38	83
3.3 Implicación de las fosfatasas de p38 en los efectos de FK506 sobre la actividad p38 en células de mamíferos	85
3.4 El tratamiento con FK506 incrementa la fosforilación de eIF2 $\alpha$ de una manera dependiente del triptófano extracelular	86
3.5 La inhibición de p38 por FK506 sensibiliza a las células de mamífero a la muerte celular inducida por sorbitol	88
<b>4. Identificación de una molécula moduladora de los efectos de FK506</b>	<b>89</b>
4.1 Tungstato rescata el defecto de crecimiento inducido por FK506	89
4.2 Tungstato exagera el fenotipo de sensibilidad osmótica inducida por FK506	90
4.3 Tungstato refuerza la activación de la ruta de control traduccional inducida por FK506	91
4.4 Tungstato modula la ruta <i>HOG</i> de respuesta a estrés osmótico	93
<b>5. Caracterización de los efectos de tungstato</b>	<b>95</b>
5.1 Tungstato produce una serie de fenotipos relacionados con la homeostasis iónica en levadura	95
5.2 Tungstato inhibe <i>in vitro</i> a la fosfatasa Ppz1p pero no reproduce fenotipos de un mutante $\Delta ppz1,2$	96

5.3 Tungstato inhibe <i>in vitro</i> a la fosfatasa PP1 de levaduras y mamíferos	101
5.4 Una cepa con baja actividad Glc7p reproduce fenotipos inducidos por tungstato	103
5.5 Tungstato rescata el crecimiento en 3-aminotriazol de un mutante con baja actividad Gcn2p	105
5.6 El mutante con baja actividad Glc7p sólo reproduce algunos de los fenotipos inducidos por tungstato	107
5.7 La activación constitutiva de la ruta <i>GCN</i> reproduce fenotipos inducidos por tungstato	108
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>111</b>
<b>1. Efecto de FK506 en levadura</b>	113
1.1 Efecto de FK506 sobre la disponibilidad de triptófano	113
1.2 Efecto de FK506 sobre las rutas <i>GCN</i> y <i>HOG</i> . Conexión funcional entre ambas rutas.	114
1.3 Modelo de actuación de FK506 en levadura	118
<b>2. Efecto de FK506 en células humanas</b>	120
<b>3. Tungstato: una molécula moduladora de los efectos de FK506</b>	124
3.1 Efecto de tungstato sobre la toxicidad de FK506 en levadura	124
3.2 Implicación de los efectos descritos en el uso terapéutico del tungstato	129
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO: Artículos</b>	<b>163</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		página
1	Estructura molecular de FK506 y CsA	5
2	Mecanismo de acción de FK506 e hipótesis de trabajo	7
3	Control traduccional de <i>GCN4</i>	12
4	Activación de Gcn2p	14
5	Esquema de genes activados por Gcn4p	15
6	Activación de la ruta <i>HOG</i>	20
7	Activación transcripcional de genes regulados por Hog1p	22
8	Modelo comparativo de rutas de respuesta a estrés osmótico en levaduras y mamíferos	24
9	Liberación de insulina en células $\beta$ pancreáticas	27
10	Ciclo celular de la levadura	45
11	Representación esquemática de los plásmidos utilizados	51-53
12	Crecimiento de levadura con estrés osmótico y FK506	66
13	Rescate con triptófano de la sensibilidad a estrés osmótico inducida por FK506	68
14	Activación de la ruta <i>GCN</i> por FK506	70
15	Rescate de toxicidad de FK506 interrumpiendo la ruta <i>GCN</i>	72
16	Fosforilación de Hog1p en presencia de FK506	74
17	Transcripción dependiente de Hog1p con FK506	75
18	Implicación de las fosfatasas de Hog1p	76
19	La sensibilidad de $\Delta gcn2$ a FK506 se debe al ayuno	78
20	Regulación de la ruta <i>GCN</i> por Hog1p	80
21	Fosforilación de p38 por estrés osmótico con FK506	82
22	Rescate de la fosforilación de p38 con aminoácidos	84
23	Implicación de las fosfatasas de p38	85
24	Fosforilación de eIF2 $\alpha$ por FK506 en células humanas	86
25	Análisis de muerte celular inducida por FK506 y estrés osmótico	88
26	Crecimiento de levaduras en presencia de FK506 y tungstato	89

<b>27</b>	Crecimiento de levaduras en presencia de FK506, estrés osmótico y tungstato	90
<b>28</b>	Sobreactivación de la ruta <i>GCN</i> por tungstato	92
<b>29</b>	Efecto de tungstato sobre la ruta <i>HOG</i>	94
<b>30</b>	Fenotipado de tungstato	95
<b>31</b>	Activación de <i>ENA1</i> por tungstato	96
<b>32</b>	Inhibición de Ppz1p-GST por tungstato	97
<b>33</b>	Análisis de contenido celular de potasio y crecimiento en presencia de TMA e Higromicina B con tungstato	99
<b>34</b>	Efecto de tungstato sobre ciclo celular en <i>WT</i> y $\Delta ppz1,2$	99
<b>35</b>	Fosforilación de eIF2 $\alpha$ por FK506 con tungstato en $\Delta ppz1$	100
<b>36</b>	Inhibición por tungstato de Glc7p-GST y PP1	102
<b>37</b>	Crecimiento de un mutante con baja actividad Glc7p con FK506	104
<b>38</b>	Inducción de la ruta <i>GCN</i> en el mutante con baja actividad Glc7p	104
<b>39</b>	Crecimiento de un mutante con baja actividad Gcn2p con 3AT y tungstato	106
<b>40</b>	Efecto de tungstato sobre ciclo celular en el mutante con baja actividad Glc7p	107
<b>41</b>	Fenotipado de un mutante con actividad Gcn2p constitutiva	109
<b>42</b>	Modelo de toxicidad de FK506 sobre la respuesta a estrés osmótico	119
<b>43</b>	Contribución de tungstato al modelo de toxicidad de FK506	128

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		página
1	Lista de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	46
2	Lista de plásmidos	50
3	Lista de anticuerpos	60
4	Comparación del crecimiento de <i>WT</i> y mutante con actividad Gcn2p constitutiva ante distintos estreses	110