

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## **Mecanismos de homeostasis del pH intracelular en levadura: activación de la bomba de protones Pma1 y estabilidad de RNA mensajeros de ciclinas G1**

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORA:** Celia Canales Quilis

**TUTOR:** Prof. Ramón Serrano Salom

**DIRECTOR EXPERIMENTAL:** Alessandro Rienzo

Curso 2016-2017

Valencia, julio 2017



## Datos personales

Nombre y apellidos: Celia Canales Quilis

## Datos del trabajo de fin de grado

Título: Mecanismos de homeostasis del pH intracelular en levadura: activación de la bomba de protones Pma1 y estabilidad de RNA mensajeros de ciclinas G1

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor: Prof. Ramón Serrano Salom

Director experimental: Alessandro Rienzo

Lugar y fecha de lectura: Valencia, julio 2017

## Resumen

El cáncer es una enfermedad poligénica, altamente heretogénea y de causas diversas. A partir del año 2000 se propusieron diferentes características distintivas ("*cancer hallmarks*") que son comunes a los distintos tipos de cáncer. Entre ellas el valor de pH intra- y extracelular, más alcalino en el citosol y más ácido en el exterior que en células normales. El pH intracelular alto está relacionado con la regulación del crecimiento celular y la proliferación. Uno de los elementos involucrados en la regulación del pH intracelular es el sistema de expulsión de protones del citoplasma, que en caso de la levadura es la bomba de protones, o H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática Pma1, mientras que en células animales es NHE1, un antiportador de H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> menos potente que Pma1. Se ha demostrado que la expresión ectópica de Pma1 en fibroblastos de ratón aumenta el pH intracelular y causa transformación tumorigénica. TORC1, un complejo regulador del crecimiento en todos los eucariotas, está activado por pH intracelular alto, explicando el efecto de este parámetro sobre el crecimiento celular. En este trabajo se propone un modelo en *Saccharomyces cerevisiae* para estudiar el conjunto de funciones reguladoras de la homeostasis del pH, teniendo en cuenta los elementos descritos anteriormente. Para estudiar la relación entre el pH intracelular y el crecimiento se estudiaron los diferentes perfiles de crecimiento en la cepa silvestre y en mutantes con pérdida de función, en los cuales se compararon los valores obtenidos para la velocidad de crecimiento, el rendimiento y la duración de la fase *Lag* de las levaduras al suministrarles ácidos débiles. También se determinó el valor de pH intracelular de las cepas de interés y su variación al tratarlas con ácidos débiles como el acético. Por otro lado, para estudiar el papel de la fosfatasa Sit4 como posible regulador de la bomba de protones Pma1, se analizaron a través de la técnica Western Blot los niveles de fosforilación de los residuos Ser507 y Ser899 de Pma1 en la cepa silvestre y en la cepa mutante *sit4Δ* con presencia y ausencia de glucosa. Sit4 es regulada directamente por el complejo TOR y se estima que pueda tener un papel importante en la regulación de la homeostasis de pH intracelular. Por último se estudió el papel del gen SSD1 como estabilizador de los mensajeros de las ciclinas de la fase G1 del ciclo celular, como posible diana de la regulación de la proliferación.

## Palabras clave

Fosforilación, crecimiento, *Saccaromyces cerevisiae*, regulación, ciclo celular, TOR

## Abstract

Cancer is a polygenic and highly heterogeneous disease with diverse causes. Since 2000, different cancer hallmarks that are common to different types of cancer have been proposed. Among them is the intracellular and extracellular pH value, more alkaline in the cytosol and more acid in the exterior than normal cells. High values of intracellular pH are related to the regulation of cell growth and proliferation. One of the main elements involved in the pH<sub>i</sub> regulation is the proton expulsion system, which in the case of yeast is the proton pump, or H<sup>+</sup>-ATPase of the plasma membrane Pma1, whereas in animal cells it is NHE1, a H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antiporter less potent than Pma1. Ectopic expression of Pma1 in mouse fibroblasts has been shown to increase intracellular pH and cause tumorigenic transformation. TORC1, a growth regulator complex in all eukaryotes is activated by high intracellular pH, explaining the effect of this parameter in cell growth. In this study, we propose a model in *Saccharomyces cerevisiae*, to study the set of regulatory functions of pH homeostasis, taking into account the elements described above. In order to study the relationship between intracellular pH and growth, different growth profiles were studied in the wild strain and mutants with loss of function, in which the values obtained for growth rate, yield and lag phase were compared between yeasts by supplying them with weak acids. The intracellular pH value of the strains of interest and their variation were also determined by treating them with weak acids, such as acetic acid. On the other hand, to study the role of the phosphatase Sit4 as a possible regulator of the proton pump, the phosphorylation levels of residues Ser507 and Ser899 of Pma1 were analyzed through Western Blot technique in the wild strains and *sit4Δ* with presence and absence. Sit4 is directly regulated by the TOR complex and is estimated to have an important role in the regulation of pH<sub>i</sub> homeostasis. Finally, the role of the SSD1 gene as a stabilizer of cyclin messengers of the G1 phase of the cells cycle was studied as a possible target for the regulation of proliferation.

## Key words

Phosphorylation, growth, *Saccharomyces cerevisiae*, regulation, cell cycle, TOR

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Importancia del pH intracelular. ....	1
1.2 Levadura como sistema modelo. ....	2
1.3 Conocimientos de los mutantes empleados y función de TOR en la regulación del crecimiento. ....	3
1.4 Ácidos débiles y su influencia en el crecimiento celular. ....	4
1.5 Relación de Pma1 con la homeostasis del pHi y sitios de regulación. ....	5
1.6 Rol de Sit4 como fosfatasa en la activación de Pma1 .....	6
1.7 <i>SSD1</i> . Antecedentes al presente trabajo.....	7
1.8 Función e interacción de Ssd1 con mensajeros de ciclinas en la regulación del crecimiento y la proliferación. ....	8
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
3.2 Medios de cultivo para levadura.....	10
3.3 Plásmido p987 .....	10
3.4 Cebadores.....	11
3.5 Bioscreen .....	11
3.6 Medida del pH intracelular (pHi) con <sup>14</sup> C-propiónico.....	12
3.7 Análisis Western Blot .....	13
3.7.1 Extracción de proteínas.....	13
3.7.2 Cuantificación de proteínas.....	13
3.7.3 Tratamiento de las muestras para la electroforesis.....	13
3.7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	14
3.7.5 Transferencia a membrana .....	14
3.7.6 Tinción con Direct Blue .....	15
3.7.7 Anticuerpos de reconocimientos .....	15
3.7.8 Inmunodetección .....	15
3.8 “ <i>Stripping</i> ” de membrana .....	15
3.9 Dot blot.....	15
3.10 Cuantificación por qPCR.....	16
3.10.1 Extracción del RNA .....	16

3.10.2 Purificación de las muestras de RNA.....	16
3.10.3 Conversión del RNA a cDNA.....	16
3.10.4 qPCR .....	17
4. RESULTADOS .....	18
4.1 Comparación de los perfiles de crecimiento de las cepas de interés ante la presencia de ácidos débiles .....	18
4.2 Valores de pH en presencia y ausencia de ácidos débiles .....	23
4.3 Influencia de la presencia/ausencia de glucosa sobre la fosforilación del residuo Ser507 de Pma1 y efecto de la delección de <i>SIT4</i> .....	24
4.4 Concentración del RNAm de <i>CLN3</i> en BY4741 y <i>ssd1Δ</i> .....	25
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIONES .....	29
7. BIBLIOGRAGFÍA .....	30

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Valores del $pH_e$ y $pH_i$ en células tumorales y células normales.....	1
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas.....	10
<b>Tabla 3.</b> Secuencias y posiciones de los primers utilizados para la cuantificación de <i>CLN3</i> .....	11
<b>Tabla 4.</b> Composición de los geles para la electroforesis.....	14
<b>Tabla 5.</b> Composición del <i>RNA isolation buffer</i> para la extracción de RNA.....	16
<b>Figura 1.</b> Hipótesis de la cascada de sucesos y sus consecuencias en el proceso de carcinogénesis.....	2
<b>Figura 2.</b> Comparación de los complejos TOR en levadura y mamíferos.....	4
<b>Figura 3.</b> Esquema de la membrana de <i>cerevisiae</i> con los principales componentes del mantenimiento de la homeostasis del $pH_i$ .....	5
<b>Figura 4.</b> Esquema de la función de Sit4 dependiendo del estado de TORC1, modulado por la disponibilidad de nutrientes.....	7
<b>Figura 5.</b> Mapa de restricción del plásmido pRS416 comercializado por <i>Addgene</i> .....	11
<b>Figura 6.</b> Esquema de las capas posicionadas para la transferencia del gel de electroforesis a la membrana de PVDF.....	14
<b>Figura 7.</b> Datos de la duración de la fase <i>Lag</i> de las cepas BY4741, <i>sit4Δ</i> y <i>tco89Δ</i> en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en minutos. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 en YPD pH 6.....	18
<b>Figura 8.</b> Datos de la velocidad de crecimiento en porcentaje de las cepas BY4741, <i>sit4Δ</i> y <i>tco89Δ</i> en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 en YPD pH 6.....	19
<b>Figura 9.</b> Datos del rendimiento en porcentaje de las cepas BY4741, <i>sit4Δ</i> y <i>tco89Δ</i> en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en el cepa BY4741 en YPD pH 6.....	20
<b>Figura 10.</b> Datos de la duración de la fase <i>Lag</i> de las cepas BY4741 + p987, BY4741 +p987- <i>SSD1-V</i> , RS132 + p987 y RS132 + p987- <i>SSD1-V</i> en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en horas. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 + p987 en YPD pH 6.....	21
<b>Figura 11.</b> Datos de la velocidad de crecimiento en porcentaje de las cepas BY4741 + p987, BY4741 +p987- <i>SSD1-V</i> , RS132 + p987 y RS132 + p987- <i>SSD1-V</i> en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 + p987 en YPD pH 6. ....	21

<b>Figura 12.</b> Datos del rendimiento en porcentaje de las cepas BY4741 + p987, BY4741 + p987-SSD1-V, RS132 + p987 y RS132 + p987-SSD1-V en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor de la cepa BY4741 + p987 en YPD pH 6.....	22
<b>Figura 13.</b> Cinética de valores de pH <sub>i</sub> en las cepas BY4741, <i>sit4Δ</i> y <i>tco89Δ</i> en presencia/ausencia de ácido acético 60mM.....	23
<b>Figura 14.</b> Resultados del revelado de la membrana para los sitios Ser507 y el aminoácido 838 de la Pma1. (A) Anticuerpo contra el sitio Ser507. (B) Misma membrana tras un “stripping” usando un anticuerpo contra el aminoácido 838 de la Pma1 para el control de carga.....	25
<b>Figura 15.</b> Niveles de expresión del mensajero de <i>CLN3</i> en las cepas BY4741 (A) y <i>ssd1Δ</i> (B), en cuatro condiciones: células en fase estacionaria con YPD pH 3.7; células incubadas 5 horas con YPD pH 3.7; células incubadas 5 horas con YPD más 35mM y 50mM de ácido acético.....	26

## ABREVIATURAS

Ach: ácido acético	pHi: pH intracelular
ADP: adenosín difosfato	pHe: pH extracelular
AMPc: adenosín monofosfato	pKa: constante de disociación ácida
APS: persulfato de amonio	Pma1: H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática de levadura
atm: atmósfera	PPP: fosfoproteína fosfatasa
ATP: adenosín trifosfato	PVDF: polifluoruro de vinilideno
BSA: albúmina de suero bovino	qPCR: PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Cdk: kinasa dependiente de ciclinas	RAM: Regulación de Ace2 y morfogénesis polarizada
cDNA: ADN complementario	RNA: ácido ribonucleico
cpm: cuentas por minuto	rpm: revoluciones por minuto
C-terminal: carboxi-terminal	SD: dextrosa sintética. Medio de cultivo mínimo para levadura
DNA: ácido desoxirribonucleico	SDS: dodecilsulfato sódico
DNAasa: DNA endonucleasa	Ser: Serina
DTT: Dicloro-difenil-tricloroetano	TAE: Tris-acetato-EDTA
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	TBS: Solución salina tamponada con Tris
g: gramos	TCA: tricloro-acético
HCl: ácido clorhídrico	TEMED: tetrametiletilendiamina
Kb: kilobases	Thr: treonina
KCl: Cloruro de potasio	TOR: Target Of Rapamycin
L: litros	Tris: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Lag: tiempo de latencia	µg: micro-gramos
M: molaridad	µl: micro-litros
MES: Ácido 2- (N - morfolino) etanosulfónico	URA: uracilo
MgCl <sub>2</sub> : cloruro de magnesio	UTR: untranslated region. Región sin transcripción
ml: mililitros	V: voltios
mM: mili-molar	VMA: H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana vacuolar
mRNA: RNA mensajero	YPD: extracto de levadura-peptona-dextrosa. Medio de cultivo rico para levadura
mV: mili-voltios	
NaHCO <sub>3</sub> : bicarbonato de sodio	
nm: nanómetros	
N-terminal: amino-terminal	
OD: densidad óptica	
ORF: marco abierto de lectura	
pb: pares de bases	
PCI: fenol-cloroformo-etanol isoamílico	



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia del pH intracelular.

Los esfuerzos actuales de la investigación biomédica se centran en el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer específicas de cada tipo de tumor. A partir del año 2000 se empezaron a introducir características distintivas del proceso carcinogénico (“*cancer hallmarks*”). Entre ellas se describieron el transporte iónico y el  $pH_i$ , que regulan numerosos procesos fisiológicos como el crecimiento y la proliferación celular, la actividad mitocondrial, el potencial de membrana, el volumen celular, la síntesis de DNA, la actividad enzimática, la diferenciación y la oncogénesis, entre otras (Harguindey *et al.*, 2005).

Las células cancerígenas tienen un balance ácido-base diferente al observado en tejidos normales y este desequilibrio aumenta conforme se avanza en el estado neoplásico (J. Reshkin, *et al.*, 2012). En estas células se produce una acidificación del entorno extracelular ( $pH_e$ ) y una alcalinización del medio intracelular ( $pH_i$ ), como se muestra en la Tabla 1:

	$pH_e$	$pH_i$
<b>Células tumorales</b>	6.2-6.9	7.12-7.7
<b>Células normales</b>	7.3-7.4	6.99-7.05

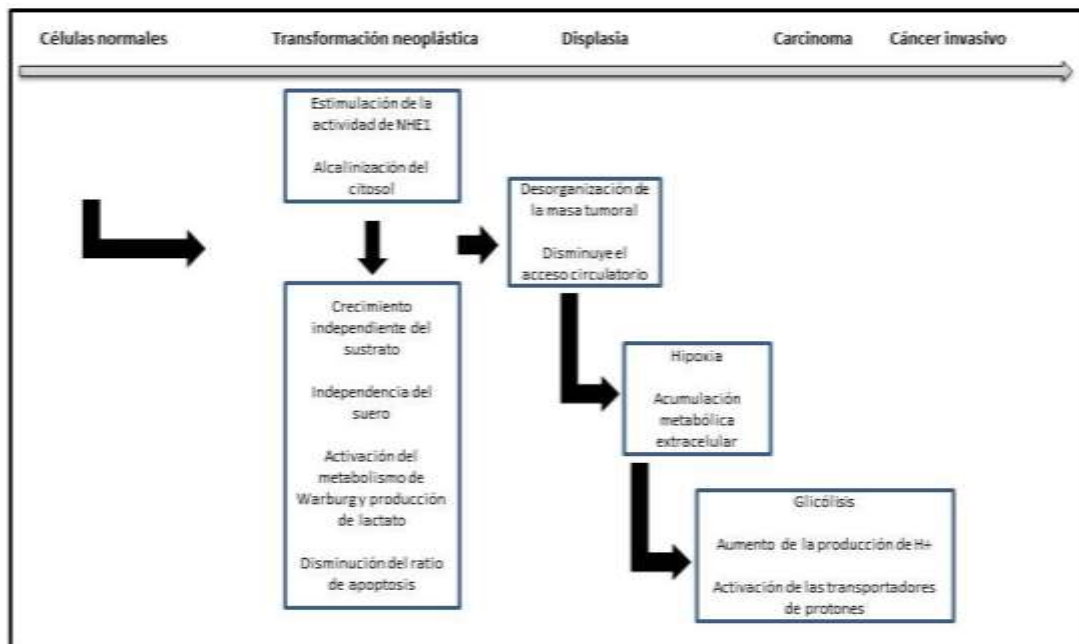
Tabla 1. Valores del  $pH_e$  y  $pH_i$  en células tumorales y células normales. Las células transformadas tienen un  $pH_i$  más alcalino y un  $pH_e$  más ácido

Este cambio genera un gradiente de pH reverso a lo largo de la membrana celular (Calderon-Montano *et al.*, 2011). El gradiente reverso de pH entre el interior y el exterior de la célula se genera independientemente de la naturaleza de la patología o los orígenes genéticos que ésta pueda tener. Por tanto, permitiría una terapia general de todos los tipos de tumores. El gradiente reverso empieza en las primeras fases de la transformación neoplásica y está fuertemente asociado con la aparición temprana del metabolismo glicolítico en presencia de oxígeno, lo que se conoce como efecto Warburg (Weinhouse *et al.*, 1956). Se cree que un cambio rápido del metabolismo de la célula pueda ser seguido de una alcalinización del citoplasma por la modulación de sistemas de expulsión de protones. Mediante la expresión inducida de un oncogén (HPV16 E7) para dilucidar la aparición cronológica de los *hallmarks* en la transformación de células normales a células tumorales, se constató que el primer paso para la transformación era la activación de NHE1 (intercambiador de  $Na^+/H^+$ ). La activación de este intercambiador produce la subsecuente alcalinización del citosol (Figura 1) (Reshkin, 2000).

El mantenimiento de este gradiente reverso se basa en la capacidad de las células tumorales de transportar protones hacia el exterior. Esta habilidad depende del intercambiador NHE1 y de sistemas de toma de bicarbonato (J. Reshkin, *et al.*, 2012). La toma de bicarbonato es equivalente a la expulsión de protones por el equilibrio del ácido carbónico a ambos lados de la membrana, catalizados por la anhidrasa carbónica.

Una vez el gradiente reverso del pH se genera y se mantiene, el incremento del  $pH_i$  en las células transformadas favorece la progresión continua del ciclo celular y la adquisición de independencia al sustrato y al suero. Esto resulta en un aumento desorganizado del número y la densidad celular (Cardone, *et al.*, 2005), como se describe en la Figura 1. El aumento de densidad celular se corresponde con una disminución del acceso circulatorio que crea la condición de hipoxia y una necesidad de neoangiogénesis (Reshkin, *et al.*, 2014). La formación de nuevos vasos se lleva a cabo de manera caótica, generando una pobre vascularización que es incapaz de cubrir la demanda de oxígeno del tumor. Como consecuencia, se excreta ácido

lácido que disminuye todavía más el valor del pH extracelular. Todos juntos, estos procesos favorecen el microambiente tumoral específico para la metástasis (Reshkin, *et al.*, 2014).



**Figura 1. Hipótesis de la cascada de sucesos y sus consecuencias en el proceso de carcinogénesis.** Se contemplan desde las primeras fases de transformación hasta la adquisición del carácter invasivo.

## 1.2 Levadura como sistema modelo.

Se escogió *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para el presente estudio. Este hongo unicelular es un tipo de levadura ampliamente utilizada tanto en procesos industriales como la fabricación de pan, cerveza y vino, como en la investigación científica. Se trata de un organismo eucariota cuya maquinaria molecular se mantiene conservada en numerosos procesos celulares, siendo altamente homóloga con plantas y mamíferos. Al ser eucariota, presenta cierta complejidad al compararla con la manipulación de bacterias, pero comparte con estos organismos otras ventajas técnicas: no presenta patogenicidad, por lo que su manipulación en el laboratorio se puede llevar a cabo sin precauciones extremas, es fácil de cultivar y no requiere procedimientos excesivamente técnicos.

La levadura tiene un sistema de transformación de DNA sencillo y versátil que facilita la generación, el aislamiento y la caracterización de mutantes durante la fase haploide. Además, es uno de los organismos eucariotas más estudiados: el proyecto de secuenciación de esta levadura fue uno de los primeros llevados a cabo y sirvió como modelo para numerosos proyectos de secuenciación posteriores (Giaever and Nislow, 2014). Es por ello que se conoce la secuencia completa y la organización funcional de su genoma, lo que ha permitido la manipulación genética de la práctica totalidad de sus genes, el uso de micromatrices de DNA en transcriptómica y estudios a nivel genómico, como la caracterización de todas sus ORF (Winzeler *et al.*, 1999). Con esta levadura se ha generado una colección completa con más de 21000 cepas con mutaciones precisas de deleciones de alrededor 6000 ORFs (Giaever and Nislow, 2014), algunas de las cuales se usaron en el proyecto.

### 1.3 Conocimientos de los mutantes empleados y función de TOR en la regulación del crecimiento.

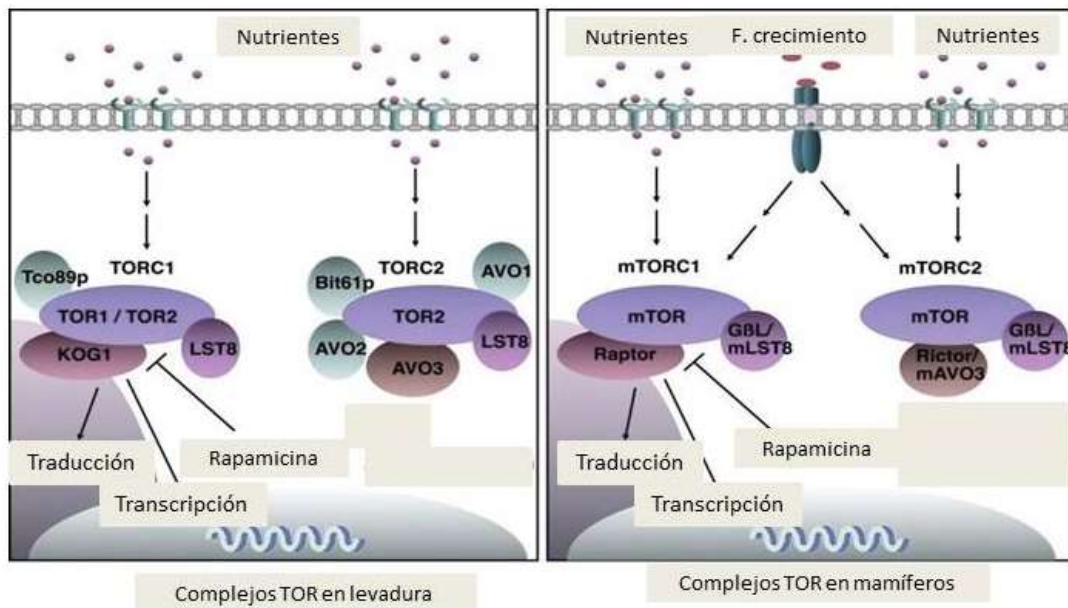
En el presente estudio se utilizaron dos cepas silvestres: BY4741 y RS132, explicadas en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. También se utilizó una serie de mutantes con pérdida de función obtenidos de la colección antes mencionada. Estos mutantes se emplearon para comprender la función de los genes suprimidos mediante el estudio del fenotipo que se obtiene al eliminarlos. Por ello, es preciso hacer una breve descripción de los conocimientos actuales sobre la función de dichos genes y cuáles son las particularidades de las cepas en las cuales se encuentran delecionados.

Sit4 / YDL047W. Sit4 es una proteína con actividad fosfatasa en residuos de Ser/Thr. Se encuentra en el citoplasma y en el núcleo, formando parte del complejo con actividad fosfatasa PPP6, homólogo al complejo 2A en mamíferos (Barbosa AD, *et al.*, 2016). La deleción de este gen no es letal para la levadura, sin embargo, su eliminación produce: defectos en el crecimiento fermentativo y respiratorio, mayor sensibilidad a la temperatura (Stark, 1996), menor longitud de los telómeros, mayor sensibilidad a tóxicos y a estreses hiperosmóticos, entre otros.

Ssd1 / YDR293C. El gen *SSD1* es un supresor de la deleción de SIT4. Está involucrado en un amplio número de funciones, como el procesado de mRNA, la traducción, el envejecimiento, la integridad de la pared celular, la respuesta a estrés (Stettler *et al.*, 1993) y el crecimiento polar (Racki *et al.*, 2000). Además participa en el control de la traducción y la localización de mRNA, siendo capaz de unirse a las regiones 3' y 5' UTRs de éstos (Hogan *et al.*, 2008). Los mutantes con pérdida de función para este gen son sensibles a la temperatura, al Calcofluor White (indicador de defectos en la membrana) y a diferentes tóxicos como la rapamicina.

Tco89 / YPL180W. *TCO89* codifica para una proteína de función desconocida. Tco89 se puede encontrar como componente extrínseco en el lado citosólico de la membrana celular o en la membrana vacuolar. Es una proteína componente del complejo TORC1 (Reinke *et al.*, 2004) y es necesaria para la activación del transporte de K<sup>+</sup> (Mahmoud *et al.*, 2017). La cepa mutante *tco89Δ* tiene una morfología de la pared celular anormal, es más sensible a la temperatura y sufre un aumento en la resistencia a estrés oxidativo.

TORC (*Target Of Rapamycin Complex*) es un complejo kinasa presente en todas las eucariotas examinadas (Dennis, *et al.*, 1999). En levadura hay dos genes codificantes para TOR: *TOR1* y *TOR2*. La proteína Tor2 puede formar parte de ambos complejos (TORC1 y TORC2), pero Tor1 sólo compone TORC1. *TOR2* es un gen esencial, mientras que *TOR1* no (Mahmoud *et al.*, 2017). Estas dos proteínas comparten un 67% de homología de secuencia y una función parcialmente redundante (Helliwell *et al.*, 1994). Este complejo regula el crecimiento celular respondiendo a la disponibilidad de nutrientes mediante: síntesis proteica, biogénesis de ribosomas, inducción de la autofagia y control del ciclo celular (Reinke *et al.*, 2004). Todos estos procesos sugieren que las proteínas que forman TORC1/TORC2 actúan a través de una red de señalización intracelular que controla el crecimiento, por lo que mutaciones en *TCO89* en combinación con inactivaciones en TOR son letales para la célula.



**Figura 2. Comparación de los complejos TORC en levadura y mamíferos.** Tanto en levadura como en mamíferos hay dos complejos, denominados TORC1 y TORC2 en levadura y mTORC1 y mTORC2 en mamíferos. TORC1 contiene o Tor1 o Tor2 junto con Kog1, Lst8 y Tco89, y es sensible a la rapamicina. TORC2 está formado por Tor2 junto con Avo1-3p, Bit61p, y Lst8p, regula la organización del citoesqueleto y no es sensible a la rapamicina. En mamíferos mTORC1 se compone de mTOR, Raptor y G $\beta$ L con función similar al complejo TORC1 de levadura; y el complejo mTORC2 formado por Rictor y G $\beta$ L (Inoki et al., 2005.)

#### 1.4 Ácidos débiles y su influencia en el crecimiento celular.

Un ácido débil es aquel ácido que no está totalmente disociado en una disolución acuosa y es capaz de aportar y recibir protones. En una disolución acuosa con ácidos débiles hay una cantidad significativa de ácido que permanece sin disociar, mientras que el resto del ácido se disocia en protones y en aniones del compuesto, formando un equilibrio ácido-base. En el presente proyecto se utilizaron ácidos débiles para generar una acidificación intracelular en las distintas cepas de levadura. Se eligieron ácidos débiles en función de sus constantes de disociación ácida y a unas concentraciones adecuadas que pudieran comprometer el desarrollo natural de las cepas, para evidenciar diferencias en la resistencia y el crecimiento entre ellas.

Concretamente, se utilizó el ácido acético ( $pK_a$  4.76), que es un producto de la fermentación alcohólica de *S. cerevisiae*. Este compuesto no es metabolizado cuando en la levadura hay represión por glucosa y entra en la célula de forma no disociada por difusión simple (Ludovico *et al.*, 2001). La facilidad con la que el ácido difunde dentro de la célula depende del valor de la constante de disociación ácida ( $pK_a$ ) del ácido en cuestión. Dentro de la célula, el ácido se disocia y si el pH extracelular es más bajo que el pH intracelular, se produce una acidificación intracelular y una acumulación aniónica (Pampulha and Loureiro, 1989). El ácido acético compromete la viabilidad de la integridad celular, inhibe la fermentación, reduce el ratio de crecimiento (Palmqvist *et al.*, 1999) y hasta produce la muerte a concentraciones muy altas. También se utilizó el ácido sórbico ( $pK_a$  4.76), que es utilizado para prevenir la multiplicación de levaduras (Tabanelli *et al.*, 2016), a una concentración de 1.5 mM.

### 1.5 Relación de Pma1 con la homeostasis del pH<sub>i</sub> y sitios de regulación.

Dentro de los elementos celulares que regulan la homeostasis del pH<sub>i</sub> se encuentran las bombas de protones, o H<sup>+</sup>-ATPasas. Las más importantes en levadura son Pma1 en la membrana plasmática y Vma en la membrana vacuolar. Pma1 es una H<sup>+</sup>-ATPasa perteneciente a la familia P2 de las bombas de protones (Lutsenko and Kaplan, 1995). Es una proteína de 100 kDa, compuesta por 918 aminoácidos. Se compone de 10 segmentos transmembranales con una región citoplasmática en la que se encuentran los extremos C- y N-terminal. Funcionalmente, el dominio catalítico también se encuentra en la cara citosólica y se distinguen el dominio A, de actuación; el N, de unión nucleotídica y el P, de fosforilación (Kühlbrandt, 2004).

Pma1 es una de las proteínas de membrana más abundantes en levadura (10<sup>6</sup> moléculas por célula), lo que representa el 15% de las proteínas de membrana totales (Serrano, 1988). La función de esta bomba consiste en excretar protones fuera de la célula. Este proceso crea un gradiente electroquímico de protones esencial para la regulación del pH<sub>i</sub> y conlleva un gasto del 20% de la producción celular de ATP (Lee *et al.*, 2016). El gradiente generado produce un flujo activo de entrada de nutrientes y salida de aniones e iones sodio, tóxicos para la célula. Ésta palia el efecto de salida constante de protones mediante la entrada de iones potasio, mediada por las proteínas Trk1 y 2 (Madrid *et al.*, 1998). El transporte de potasio hacia el interior celular provoca también una despolarización de la membrana, lo que incrementa la estimulación de Pma1 y la alcalinización del citosol (Rodríguez-Navarro, 2000). Recientemente se demostró que los niveles internos de potasio y el complejo TORC1 están relacionados: el crecimiento con niveles limitados de potasio altera la actividad de kinasas efectoras de TOR como Sch9 o Npr1 y, recíprocamente, la inhibición con rapamicina de TOR reduce la acumulación de potasio (Primo *et al.*, 2016). Pma1 y Trk1/2 son el mayor determinante del potencial de membrana y el pH<sub>i</sub>, por lo que deben ser regulados conjuntamente (Mollinedo, 2012).

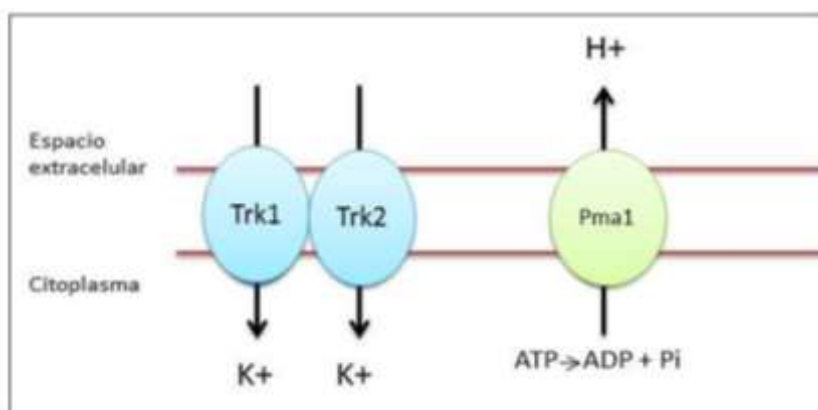


Figura 3. Esquema de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* con los principales componentes del mantenimiento de la homeostasis del pH<sub>i</sub>. Pma1 utiliza la energía de la conversión de ATP para la excreción de protones, mientras que Trk1 y Trk2 minimizan los efectos de la salida de protones mediante la introducción de K<sup>+</sup>.

La actividad de Pma1 es modulada por diversos factores ambientales, siendo uno de los más importantes el metabolismo de la glucosa. La disponibilidad de glucosa regula la actividad de la bomba de protones a nivel transcripcional y post-traducciona (Lee *et al.*, 2016) y los cambios que produce son reversibles. Por un lado, la glucosa induce un aumento moderado en la expresión de Pma1 a través de la regulación de factores de transcripción como Rap1 y Gvr1 (Rao, *et al.*, 1993). Este aumento de la expresión consigue un incremento de la actividad de la bomba de 5 a 10 veces (Lecchi, *et al.*, 2007). Por otro lado, la glucosa favorece la actividad catalítica de la ATPasa, y por tanto, la expulsión de protones. Como consecuencias

inmediatas de la activación por glucosa se produce un aumento de la afinidad de la bomba por el ATP y un aumento de la velocidad máxima (Mazón, *et al.*, 2015).

En esta activación podría participar la señalización de calcio, el inositol trifosfato y la proteasa de membrana Lpx1 (Campetelli *et al.*, 2005). La actividad de la bomba se ve alterada en presencia de inhibidores de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la región C-terminal de la Pma1 contiene sitios de fosforilación para una kinasa dependiente de calcio (Cunningham, 2011). Estudios bioquímicos y genéticos revelaron entre otros, 4 aminoácidos importantes en la activación de la ATPasa:

- Ser507. Está localizada en el dominio N de Pma1.
- Ser889. Se encuentra en el extremo C-terminal de la enzima y es diana de la kinasa Ptk2. El sitio se mantiene fosforilado en presencia de glucosa, lo que produce un aumento de afinidad de Pma1 por el ATP (Mazón, *et al.*, 2015).
- Ser911/Thr912, también localizados en el extremo C-terminal. Estos sitios están regulados por la presencia de glucosa, pero de forma independiente a la ruta TOR. Las kinasas que fosforilan estos residuos son desconocidas, pero su fosforilación produce un incremento de hasta 10 veces en la actividad de la bomba (Lecchi *et al.*, 2007).

Por otra parte, la activación de Pma1 puede ser inducida por la acidificación externa. Con activación ácida no hay cambios observables en la fosforilación de la Ser889 (Mazón, *et al.*, 2015), pero se genera un ligero aumento en el nivel de fosforilación en Ser911/Thr912. Las diferencias que se producen en la activación por un cambio de pH del medio son cambios irreversibles. Sin embargo, tanto la activación por glucosa como por acidificación mejoran la afinidad de la bomba por el ATP (Mazón, *et al.*, 2015). En estudios previos se demostró que la exposición de *S.cerevisiae* a ácido acético durante 12 h producía un aumento en el nivel transcripcional de Pma1 de 17 veces (Lee *et al.*, 2015). Esto sugiere que la sobreexpresión de Pma1 es vital para la adaptación al estrés ácido.

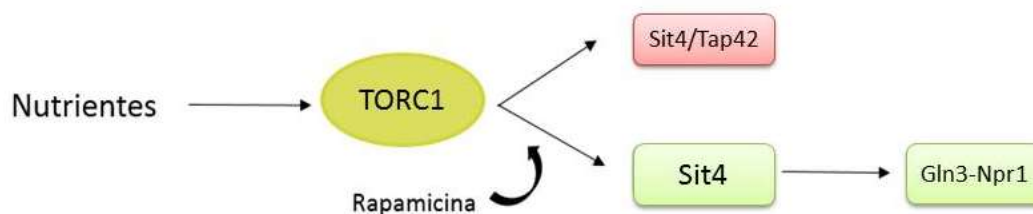
Pma1, además de depender de la disponibilidad de glucosa y de la acidificación externa, es regulada por el complejo TOR (Mahmoud *et al.*, 2017). En mutantes termosensibles para TORC2, la exposición a temperaturas no permisivas provoca una disminución en la actividad de la bomba de protones (Mahmoud *et al.*, 2017), así como la exposición de rapamicina en cepas silvestres.

## 1.6 Rol de Sit4 como fosfatasa en la activación de Pma1.

*SIT4* fue originalmente identificado en *S. cerevisiae* generando mutaciones que recompusieran la transcripción del gen *HIS4* en ausencia de *GCN4*, *BAS1* y *BAS2* (Arndt, *et al.*, 1989). *SIT4* codifica la subunidad catalítica de la fosfatasa PPP6, perteneciente a la familia de las fosfoproteínas fosfatasa o PPPs. Las PPPs son un grupo de fosfatasas con diana en los residuos serina/threonina en eucariotas. Permanecen altamente conservadas en levadura y humanos y participan en procesos vitales para las células como la proliferación y muerte celular, la movilidad, las dinámicas del citoesqueleto, el control del ciclo celular, y la regulación de numerosas cascadas de señalización (Janssens and Goris, 2001). En levadura hay 12 genes que codifican las subunidades catalíticas de las diferentes clases de PPPs (7 en total). La proteína Sit4 comparte más de un 50% de homología con la subunidad catalítica de las fosfatasas de tipo 2A (PP2A) (Arndt, *et al.*, 1989) y un 40% de homología con la subunidad catalítica de las fosfatasas de tipo 1 en mamíferos (Sutton, *et al.*, 1991).

Sit4 juega un papel esencial en la homeostasis iónica (Masuda *et al.*, 2000), la integridad de la pared celular, el crecimiento de las células en condiciones aerobias (Jablonka *et al.*, 2006), en la regulación del ciclo celular, pues modula la progresión hacia la fase S

(Angeles de la Torre-Ruiz, 2002) y también participa en la cadena de señalización dependiente de kinasas mediada por TOR (Torres, 2002). TORC1 activo inhibe la actividad de Sit4 promoviendo la unión de ésta con Tap42 (Di Como and Arndt, 1996), uno de los sustratos de TOR conocidos. Por otro lado, Sit4 activo desfosforila y por tanto, activa la proteína kinasa Npr1, un estabilizador de transportadores de aminoácidos y el factor de transcripción Gln3, ambos relacionados con el metabolismo del nitrógeno (Jacinto *et al.*, 2001).



**Figura 4. Esquema de la función de Sit4 dependiendo del estado de TORC1, modulado por la disponibilidad de nutrientes.** Cuando TOR es inactivado por Rapamicina, Sit4 desfosforila y activa Gln3 y Npr1.

Lo que se pretende demostrar en este trabajo es que hay una participación de Sit4 en cuanto a la regulación de Pma1 mediada por TOR. Sit4 actúa “aguas abajo” de TOR, es por ello que se presenta esta proteína como posible intermediario de la activación.

### 1.7 SSD1. Antecedentes al presente trabajo.

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio del profesor Ramón Serrano, se llevó a cabo una sobreexpresión moderada de genes candidatos que participaran en el transporte de protones, en sistemas sensibles al pH<sub>i</sub> o que regularan el crecimiento y la proliferación. Esto permitió identificar el plásmido p7, un plásmido centromérico proveniente de la cepa S288C con tolerancia al ácido acético. Se consiguió la duplicación de la dosis génica de 3 genes, siendo uno de ellos SSD1, el cual se identificó como uno de los responsables de la tolerancia a la acidificación intracelular (TFG de Manuel Bernabeu, 2015).

SSD1 es un gen de 4.9 Kb cuyo producto génico da lugar a una proteína con capacidad de unión al mRNA. Contiene un dominio C-terminal similar a la RNasa II, pero sin los residuos necesarios para la función catalítica, y un extremo N-terminal con dominios conservados de función desconocida (Wanless, *et al.* 2014). La proteína en cuestión tiene un papel en el control de la traducción y es recluida en los denominados “cuerpos P”, que son focos citoplasmáticos donde se acumulan mRNA eliminados de la traducción activa (Jansen *et al.*, 2009). Ssd1 es regulada negativamente por la proteína kinasa Cbk1 (Wanless, *et al.*, 2014), fosforilando directamente el extremo N-terminal. Esta fosforilación no afecta a la habilidad de Ssd1 de unirse a mRNA, sino que reduce su capacidad de bloquear la traducción de los mensajeros asociados (Jansen *et al.*, 2009). La localización de la proteína parece ser decisiva para su función (Kurischko *et al.*, 2011). Suele encontrarse en el citoplasma pero también contiene una secuencia de localización nuclear en su extremo C-terminal (Miller and Cross, 2001), por lo que se encuentra transitoriamente en el núcleo.

Se han descrito dos alelos para el gen SSD1 en levadura, siendo estos SSD1-d y SSD1-V. El primero es un alelo recesivo que combinado con una mutación en SIT4 resulta letal para la levadura. El segundo resulta de suprimir mutaciones en genes relacionados con la respuesta de AMPc (Sutton, *et al.*, 1991). Este alelo es capaz de restaurar la resistencia a temperatura en caso de que haya mutaciones en TOR1 (Mahmoud *et al.*, 2017). El gen SSD1 y su producto génico son diferentes en las dos cepas silvestres utilizadas en el presente trabajo, siendo de

1250 aminoácidos en BY4741 y de 697 aminoácidos en la RS-132 (TFG Cristina Trujillo, 2016) resultando en el segundo caso una proteína truncada que pierde parte del dominio de homología con la RNAsa II, por lo que la cepa RS132 no tiene *SSD1* funcional.

### **1.8 Función e interacción de Ssd1 con mensajeros de ciclinas en la regulación del crecimiento y la proliferación.**

Aunque la función de Ssd1 permanece siendo una incógnita, su función está directamente relacionada con la ruta RAM (Kurischko *et al.*, 2011). Esta ruta ayuda a controlar la renovación de la pared celular mediante la represión de proteínas implicadas en la expansión celular. Pero también se ha relacionado con la progresión del ciclo celular, la secreción, la longevidad, la patogenicidad, la termotolerancia y la morfogénesis celular, entre otras funciones (Mir, *et al.*, 2008). Además, participa en la progresión del ciclo celular hacia la fase S, estabilizando diferentes moléculas de mRNA (Sutton, *et al.*, 1991).

Ssd1 modula la expresión de algunos genes a nivel transcripcional y/o traduccional (Ohyama, Kasahara and Kokubo, 2010). Aunque el efecto sea indirecto, los ratios de diversos mRNA decaen más rápidamente en células que expresan Ssd1 funcional, a pesar de no asociarse con él (Jansen *et al.*, 2009). Además muchos genes se expresan de forma diferente dependiendo de la presencia o no de este gen.

Ssd1 tiene capacidad para unirse a secuencias de mRNA y al dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Phatnani, *et al.*, 2004). En concreto tiene capacidad para unirse a más de 150 mRNA *in vivo*, entre ellos, los mensajeros de las ciclinas (Jansen *et al.*, 2009). Las ciclinas son una familia de proteínas que forman complejos con las Cdks (enzimas kinasas dependientes de ciclinas). La concentración de ciclinas en la célula varía dependiendo del momento del ciclo celular, por lo que su regulación es esencial para pasar de una fase del ciclo a otra.

Cln3 es una de las ciclinas más importantes: alrededor de 800 genes son periódicamente transcritos durante el ciclo celular y *CLN3* es uno de los transcritos más tempranos de la fase G1 (Rowicka *et al.*, 2007). Activa a Cdc28 para promover la transición de la fase G1 a la fase S y regula la transcripción de otras ciclinas G1, como *CLN1* y *CLN2*. *CLN3* y la proteína que codifica son regulados en múltiples niveles: a nivel transcripcional, *CLN3* es activado por glucosa (Parviz F. *et al.*, 1998); la disponibilidad de los mensajeros de *CLN3* es regulada por Whi3, una proteína de unión a RNA (Garí E, *et al.*, 2001); y a nivel traduccional es regulada por TORC1. Cln3 es una proteína muy inestable y está sujeta a procesos de ubiquitinización y proteólisis. La desestabilización de Cln3 es un factor determinante para el correcto arresto del ciclo durante periodos con limitación de nitrógeno u oxígeno. Las células que no son capaces de llevar a cabo este arresto de forma eficaz entran de manera más rápida en la fase S, perdiendo viabilidad (Weinberger *et al.*, 2007).



## 2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio radican en dilucidar los mecanismos de regulación del crecimiento y proliferación en *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo como punto común el efecto del pH intracelular sobre los parámetros comparados:

- Obtención y estudio de los perfiles de crecimiento de la cepa silvestre y de cepas con pérdida y ganancia de función de genes determinados bajo condiciones de acidificación.
- Comparación del valor de  $pH_i$  en las cepas de interés en medio rico y bajo acidificación interna por ácidos débiles.
- Estudio del efecto de la glucosa en la fosforilación de Ser507 y Ser899 de la bomba de protones y caracterización del papel de Sit4 en la regulación de Pma1 mediada por TORC1.
- Disertación de la función de Ssd1 como estabilizador de mensajeros de *CLN3* en el control del ciclo celular y efecto de la presencia de ácidos débiles en la concentración de mensajeros.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas denominadas como “wildtype”. Por un lado la cepa BY4741, que es parte de un conjunto de cepas de delección derivadas de la cepa silvestre S288C (Baker Brachmann *et al.*, 1998). Por otro lado, se utilizó la cepa de laboratorio RS132 de la colección del profesor Ramón Serrano junto con otras cepas expuestas en la tabla 2:

Cepas colección Ramón Serrano	Genotipo
RS-259	BY4741 ( <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> )
	BY4741 <i>ssd1Δ</i>
	BY4741 <i>sit4Δ</i>
	BY4741 <i>tco89Δ</i>
	BY4741 + p987
	BY4741 + p987- <i>SSD1-V</i>
RS-132	<i>MATa ade1-100 his4-519 URA3-52 leu 2-33, 112::LEU2</i>
RS-639	RS132 + p987
RS-637	RS132 + p987- <i>SSD1-V</i>

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.

Las levaduras se dejaron crecer durante un tiempo determinado, dependiendo de la fase celular en las que eran requeridas, con los métodos descritos en el apartado 3.2. Las absorbancias se midieron con el UV-3100PC Spectrophotometer.

#### 3.2 Medios de cultivo para levadura

Los medios de cultivo utilizados fueron autoclavados 20 minutos, a 120 °C y 1 atm para esterilizarlos. Las células fueron crecidas en estos medios en estado líquido, a 28 °C y agitación de 200 rpm, o en medio sólido con agar.

- Medio YPD o medio rico complejo. Para medios líquidos se usó un 1% de extracto de levadura, un 2% de glucosa y un 2% de peptona bacteriológica, disueltos en agua miliQ. Para su utilización en sólido, se añadió un 2% de agar. Para obtener medios YPD con pH 3,7 se añadió ácido succínico 0.05 M + Tris Base pH 3.7. El tiempo de duplicación celular en este medio para *Saccharomyces cerevisiae* es de 90 minutos a 28 °C aproximadamente.
- Medio SD o medio pobre/mínimo. Se preparó disolviendo en agua miliQ 0.67% de *Yeast Nitrogen Base* y 2 % de glucosa en 50 mM de MES, llevado a pH 6 con Tris-Base o a pH 5,5 con succínico 50 mM. Se añadieron los aminoácidos requeridos para el crecimiento de cada cepa en función de las auxotrofías. Para la cepa RS132 se complementó con 30 µg/ml de adenina e histidina y para la cepa BY4741 con la misma concentración de metionina, histidina, uracilo y leucina. El tiempo de duplicación en medio mínimo es de 140 minutos a 28 °C para esta levadura.

#### 3.3 Plásmido p987

El plásmido utilizado en la cepa RS-639, RS-637 y RS-259 (Tabla 2) está denominado en la colección de Ramón Serrano como pRS987, comercializado por la casa Addgene como pRS416. Se trata de un plásmido centromérico con un tamaño de 4.9 Kb, al que se le puso el marcador de URA3 para seleccionar las células transformantes. También se utilizó el mismo plásmido con un inserto del alelo del gen *SSD1-V* para la cepa RS-637 (Tabla 2).

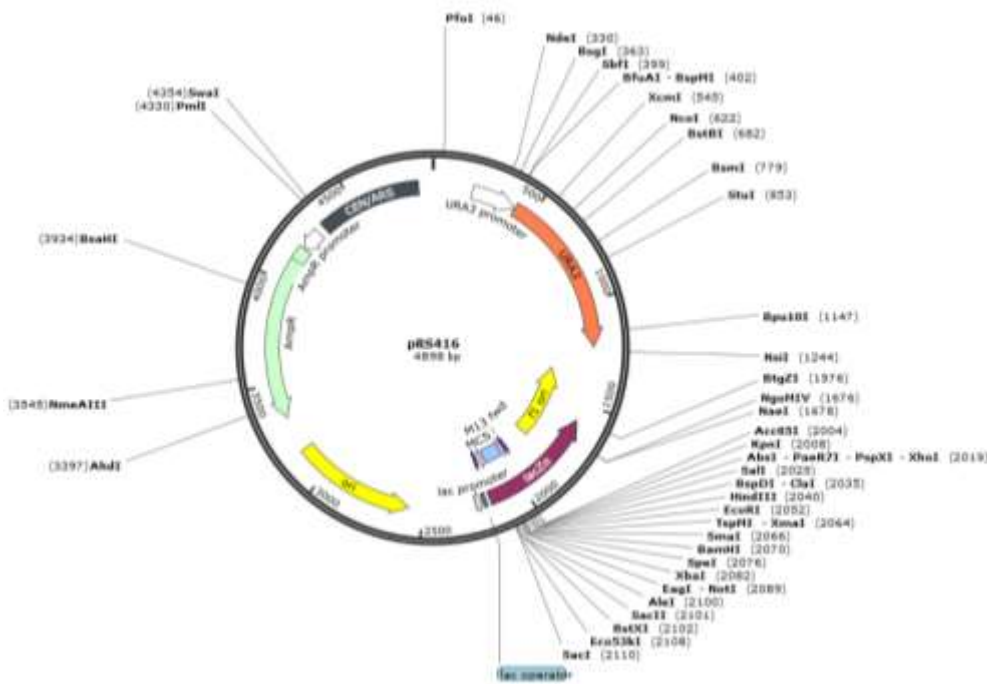


Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pRS416 comercializado por *Addgene*.

### 3.4 Cebadores

Se diseñaron cebadores para la cuantificación de mensajero de *CLN3* mediante la qPCR. Se utilizó la web [Yeast genome](#) para obtener la secuencia del gen en cuestión (*CLN3*). Esta página ofrece información sobre la función del gen, su localización, la expresión, la regulación y ofrece la secuencia tanto nucleotídica como proteica. A partir de la secuencia nucleotídica se buscaron dos fragmentos separados por una longitud de alrededor de 150 pb, cuya secuencia no superara una temperatura de melting de 60 °C y que no tuviera repeticiones seguidas de bases. La temperatura de melting se calculó con la Regla de Wallace:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ . Se utilizó [GeneRunner](#) para comprobar la posibilidad potencial de que se generaran “primer dimer” entre ambos cebadores o “loops”, y [Lundberg](#) para obtener la secuencia complementaria, generando la secuencia directa y reversa.

Cebadores <i>CLN3</i>		
Sentido	Posición	Secuencia
Forward	1343	GAAGGTTGACCAAAGATAGCAT
Reverse	1496	TCCAGTGACTCGTAGGGTG

Tabla 3. Secuencias y posiciones de los primers utilizados para la cuantificación de *CLN3*.

### 3.5 Obtención de los perfiles de crecimiento mediante análisis con Bioscreen

Para los ensayos llevados a cabo, se utilizó el Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Finlandia), un aparato que registra el crecimiento de forma continua midiendo la absorbancia de una placa multipocillo cada 30 minutos durante 72 horas.

Para obtener los perfiles de crecimiento se hizo un precultivo de las cepas de interés en medios YPD o SD y se midió la absorbancia inicial ( $OD_0$ ). Se utilizó la placa *Honeycomb*

*Microplate* de 100 pocillos, ocupando tantos como condiciones, cepas y repeticiones se requirieron. Cada pocillo se llevó a un volumen total de 350 µl haciendo 3 réplicas por condición y cepa. Se calcularon los µl de muestra necesarios para que en cada pocillo se obtuviera una absorbancia inicial de 0.05. La placa se introdujo en el Bioscreen C.

El Bioscreen generó un fichero Excel con los valores de absorbancia de las cepas analizadas. A partir de los datos crudos, se realizó un promedio con los valores de las tres réplicas. La absorbancia del primer dato de cada cepa se cambió manualmente a 0.05 para calcular la diferencia entre el primer dato generado por el Bioscreen y 0.05. Esta diferencia se descontó a todos los valores restantes. Para el cálculo de la absorbancia corregida se utilizó la fórmula  $0.449 \cdot OD^2 + 0.191 \cdot OD^3$  y se aplicó el logaritmo en base 10 de la absorbancia frente al tiempo para generar las curvas. La fase exponencial corresponde a la recta que se obtiene tras el retraso o *Lag* y antes de pararse el crecimiento (fase estacionaria). La velocidad de crecimiento ( $\mu$ , en  $h^{-1}$ ) es proporcional a la pendiente de la recta. Se eligió una condición control (BY4741 en YPD pH 6) como el 100% de la velocidad, calculándose los demás valores en función de esta. Para la determinación de la duración de la fase *Lag*, se estudió y anotó el tiempo a partir del cual los valores de la absorbancia empezaban a aumentar. Para calcular el rendimiento se eligió el valor máximo de la curva de crecimiento de cada cepa cuando esta ha alcanzado la fase estacionaria. Al igual que en la velocidad se eligió una condición control como el 100% del rendimiento, y los demás datos se obtuvieron a razón de ésta.

### 3.6 Medida del pH intracelular (pHi) con $^{14}C$ -propiónico

Se partió de un pre-inóculo de 15 ml de YPD a pH 3.7. Las células se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm y se resuspendieron en 0.5 ml del mismo medio de cultivo. Se añadió el ácido propiónico en relación 1:1000. Las células se dejaron incubando a 28°C durante 5 minutos, para permitir la difusión del ácido propiónico. Se procesó una muestra de 20 µl como dato de la radioactividad total y otra antes de añadir el ácido acético. Se calculó el volumen de ácido acético necesario según el volumen de muestra restante para obtener la concentración final requerida y se añadió. Las muestras se introdujeron después en el incubador a 27°C y en agitación a 200 rpm durante al menos 20 minutos de contacto con el ácido acético.

Para el procesado de las muestras se utilizó un sistema de filtrado al vacío y filtros *Whatman*<sup>TM</sup> CAT No. 1822-025. Se añadieron 4 ml de tampón de lavado (2 mM KCl y 1 mM MgCl<sub>2</sub>) a cada tubo con las células y se pasaron por el sistema de filtrado. La columna fue después lavada con otros 8 ml del mismo tampón. Los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente durante alrededor de 30 minutos y se introdujeron en tubos de 1.5 ml añadiéndose después 1 ml de OptiPhase HiSafe 3 Liquid scintillation cocktail de Parkin Elmer, mojando la totalidad del filtro.

Se midieron las cuentas por minuto (cpm) con Wallac 1410 Liquid scintillation counter. Este aparato realiza una medida a cada segundo durante 1 minuto y se obtuvo la media de estas medidas.

La ecuación de la que se obtiene la medida del pHi es la siguiente:

$$pHi = pHo + \log \frac{Ci}{Co} + \log \left( 1 + \frac{[Ho+]}{Ka} \right)$$

Siendo:

- pH<sub>o</sub> el pH extracelular al que se trabaja, que es constante.
- [H<sub>o</sub><sup>+</sup>] = 0.001 M

- $K_a$  es la constante ácida del ácido débil
- $C_i = C_{mp} / \mu\text{l de células} = C_{mp} / OD * 0.4 * 0.5$  (0.4 porque se consideró que para OD = 1 hay 0.4  $\mu\text{l}$  de células/ml ; y 0.5 porque es el volumen de solución que se procesó)
- $C_o = C_{mp} \text{ TOTAL} / 20 \mu\text{l}$  (medida de la radioactividad total)

### 3.7 Análisis Western Blot

#### 3.7.1 Extracción de proteínas.

Se partió de un cultivo de 50 ml con una OD correspondiente a la fase exponencial del crecimiento. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 2 ml de medio y se trataron con tampón de extracción 6x (0.3M Tris HCl pH 8; 3M de KCl; 30mM de EDTA) + 2  $\mu\text{l}$  DTT 0.5 + 80  $\mu\text{l}$  del inhibidor de proteasa 5x. Las muestras se traspasaron a un *Falcon* de 15 ml con bolas de vidrio frías (con diámetro 0.5 mm), pasando por el vórtex 1 minuto en cámara fría. Se pipeteó el contenido líquido en un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 13K 20 minutos y 4°C, recuperándose el pellet en 100  $\mu\text{l}$  de GTED 20 (20% glicerol; 10mM Tris HCl pH 7.6; 1mM EDTA; 1mM DTT). Las muestras se conservaron a -20°C.

#### 3.7.2 Cuantificación de proteínas

Fue necesaria una cuantificación de proteínas para después realizar un gel equilibrado y que los resultados fueran concluyentes. Para ello se utilizaron dos técnicas. El método Bradford, que depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico (reactivo de Bradford) y las proteínas. Es un método sensible a la presencia de contaminantes. Para generar la curva patrón se utilizó la Beta-gamma-globulina en stock al 1% con concentraciones conocidas y crecientes (0,2,4,6,7,8 y 10  $\mu\text{l}$ ). Se añadió a cada pocillo 2  $\mu\text{l}$  de muestra, haciendo 3 repeticiones. A todos los pocillos se le añadieron después 150  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford en relación 1:4. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para que la reacción se llevara a cabo y se reveló en el espectrofotómetro a 595 nm.

Por otro lado, se llevó a cabo una cuantificación mediante la tinción del gel con Azul de Coomassie (para 1 L: 450 ml de etanol 96%, 100 ml de ácido acético glacial, 2.5 g de Azul de Coomassie (R-250) y agua destilada). La intensidad de las bandas después de la tinción ofrecen una estima de la cantidad de proteínas presentes en cada carril del gel.

#### 3.7.3 Tratamiento de las muestras para la electroforesis

Se partió de 20-50  $\mu\text{g}$  de proteína, llevados a un volumen de 100  $\mu\text{l}$  con agua. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de tricloroacético (TCA) al 10% y se incubaron las muestras 20 minutos en hielo. El TCA sirvió para precipitar las proteínas e inhibir la actividad enzimática, como proteólisis o desfosforilación.

Se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las paredes del tubo con 1 ml de agua para deshacerse del ácido residual, sin tocar el pellet. Se dejaron las muestras 10 minutos en hielo y se volvieron a centrifugar 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de tampón Laemmli 1x. Por último, se dejaron 15 minutos en la incubadora a 37° y se cargaron en el gel.

### 3.7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para la separación de las proteínas según su tamaño se hizo un gel de poliacrilamida al 8% y 0.1 mm de grosor. Se introdujo entre los dos cristales el *Resolving Gel* (Tabla 4) y se añadió isopropanol para nivelar la interfase y eliminar las posibles burbujas. Una vez polimerizado, se eliminó el isopropanol y se introdujo el *Stocking Gel*, colocando un peine para generar los pocillos. Tras polimerizar, se retiró el peine y se lavaron los pocillos con agua para evitar la permanencia de sales que podrían dificultar la corrida de las proteínas en el gel.

Se cargaron los pocillos con las muestras de proteínas y en un carril a parte el marcador (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, de *Thermo Scientific*), cargando en los pocillos vacíos Laemli 1X, para que todos corran a la misma velocidad. Se añadió el tampón de electroforesis 1x (14.4 g de Glicina, 0.1% de SDS, ajustando el pH a 8.3 con Tris-Base) y se dejó con una intensidad de 11 mV durante 2 horas.

<i>Resolving Gel</i>	4.5 ml <i>resolving Buffer 2x</i>
	1.7 ml <i>Acrilamide/bis acrilamide 19:1</i>
	2,8 ml H <sub>2</sub> O
	60 µl APS 10%
	6 µl TEMED
<i>Stocking Gel</i>	1.8 ml <i>stocking Buffer 2x</i>
	1.7 ml <i>Acrilamide/bis acrilamide 19:1</i>
	1.5 ml H <sub>2</sub> O
	30 µl APS 10%
	3 µl TEMED

Tabla 4. Composición de los geles para la electroforesis.

### 3.7.5 Transferencia a membrana

Una vez corrido el gel, éste se extrajo de entre los dos cristales, se eliminó la parte del *Stocking* y se lavó con abundante agua. Para la transferencia, se usó una membrana de PVDF que fue activada con metanol durante 4 segundos. Se realizó el *sándwich* para la transferencia como se indica en la figura 6:



Figura 6. Esquema de las capas posicionadas para la transferencia del gel de electroforesis a la membrana de PVDF.

La transferencia se realizó a un voltaje de 11 V *overnight* en el tampón de transferencia Towbin 1X (14.4 g/l de glicina, 2 ml de SDS 10%, ajustado a pH 8.3 con Tris-base, 20% metanol).

### 3.7.6 Tinción con Direct Blue

Una vez transferidas las proteínas, se incubó la membrana 5 minutos en Direct Blue al 0.008% (DB 7171 al 0.1% diluido con solución de lavado (500 ml agua, 400 ml de etanol absoluto, 100 ml de ácido acético glacial). La membrana teñida se dejó durante 5 minutos en la solución de lavado hasta que únicamente se veían las bandas. Después de escanear la membrana, se destiñó utilizando la solución de desteñido (350 ml agua, 500 ml etanol absoluto y 150 ml de NaHCO<sub>3</sub> 1M) hasta que solo se vio el marcador.

### 3.7.7 Anticuerpo de reconocimiento

Se usaron dos anticuerpos de reconocimiento para testar Ser899 y Ser507 de Pma1. El anticuerpo que reconoce el sitio Ser899 fue cedido de la colección de Franciso Portillo. El anticuerpo utilizado para testar el sitio Ser507 se construyó contra el péptido KVAELA(pS<sup>507</sup>)RGFRC de Pma1. La empresa Genosphere, encargada de la comercialización, realizó dos purificaciones con cromatografía de afinidad: una contra el péptido fosforilado y otra contra el péptido no fosforilado.

### 3.7.8 Inmunodetección

La membrana se incubó con una solución de bloqueo de TBS-T: TBS 1x (para 1L: 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl), BSA 1% y Tween20 0.1% en agitación durante 2 turnos de 30 minutos. Se incubó el anticuerpo primario en una relación 1:7000 durante aproximadamente 1 hora. A continuación, se lavó la membrana 4 veces durante 10 minutos con TBS-T sin BSA y se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente en relación 1:20000. Por último, se repitieron los 4 lavados de 10 minutos con TBS-T sin BSA.

Se realizó la detección de bandas por quimioluminiscencia con ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent según las recomendaciones de Amersham™ utilizando Las3000 Luminiscent Image Analyzer de Fujifilm.

### 3.8 “Stripping” de membrana

Es un método que sirve para eliminar los anticuerpos primarios y secundarios de una membrana de PVDF. La membrana se sumergió en una solución de: 100 mM de 2-Mercaptoetanol, 2% SDS y 62.5 mM de Tris-HCl pH 6.7. Se incubó después a 50°C durante 30 minutos con agitación ocasional. La membrana se limpió tres veces en periodos de 10 minutos con TBS 1x y Tween 20 0.1% a temperatura ambiente. Por último, se bloqueó en 10 ml de TBS 1x, Tween 20 0.1% y BSA 1% durante 30 minutos.

### 3.9 Dot blot

Se utilizó una membrana de PVDF y se activó con metanol durante 4 segundos. Después fue sumergida 2 minutos en agua destilada y 5 minutos en TBS. Se depositó en una superficie pulida y se incubó con 1 µl de extracto de proteína, dejándola secar al aire. La proteína se fijó a la membrana utilizando una solución de isopropanol al 25% y de ácido acético al 10%. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS/BSA para eliminar el ácido acético y se añadió el anticuerpo secundario, realizando posteriormente los mismos lavados que en la inmunodetección.

### 3.10 Cuantificación por qPCR

#### 3.10.1 Extracción del RNA

Se partió de precultivos en fase estacionaria. A continuación se inocularon los volúmenes necesarios para obtener cultivos correspondientes a una OD de 0.2. Cada cepa fue dividida en 4 tubos (*a*, *b*, *c* y *d*). El RNA se extrajo inmediatamente del primer tubo (*a*) de cada cepa. Los otros 3 se dejaron 5 horas incubando a 28°C: el tubo *b* de cada cepa sólo contenía las células en YPD a pH 3.7; el tubo *c* contenía las células con 35 mM en el medio de ácido acético; y el tubo *d* de cada cepa contenía 50 mM en el medio de ácido acético.

Las células se centrifugaron a 4°C y 2K durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de agua fría, dividiendo el contenido en 2 tubos de 1.5 ml con 500 µl cada uno y estos se centrifugaron a 4°C y 12K durante 2 minutos. Se recuperó el pellet y se añadieron 400 µl de *Isolation Buffer* (Tabla 5), dejando la solución 5 minutos a 65°C. Las muestras se llevaron a hielo rápidamente y se añadieron 200 µl de KCl 0.3M a pH 6. Se centrifugó la mezcla a 4°C y 12K durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Se añadió PCI ácido para la fenolización y se centrifugó el contenido a 4°C y 12K durante 5 minutos y se repitió el proceso de fenolización para conseguir una mayor pureza. Se consiguió precipitar el sobrenadante con un décimo del volumen del sobrenadante de acetato sódico 3M y 2.5 v/v de etanol y se dejó a -20°C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12K y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70%, centrifugando 5 minutos a 4°C y 12K. El etanol se eliminó completamente, dejándolo evaporar para eliminar las microgotas, y se resuspendió el pellet en 100 µl de agua libre de nucleasas.

RNA isolation buffer (para 50 ml)	
SDS 10%	25 ml
EDTA 1% 0.5 M	1 ml
Mes-Tris 0.5 M a pH 6	5 ml
H <sub>2</sub> O miliQ	19 ml

Tabla 5. Composición del RNA *isolation buffer* para la extracción de RNA

#### 3.10.2 Purificación de las muestras de RNA

La purificación de RNA se llevó a cabo con el Macherey-Nagel RNA Isolation Kit.

#### 3.10.3 Conversión del RNA a cDNA

Previo a la conversión se hicieron dos pruebas para validar la presencia y el estado del RNA. Se llevó a cabo una medida con Nanodrop para cuantificar la concentración de RNA y su estado a través de la curva generada por el aparato (absorción a 260 nm) y se llevó a cabo un gel de agarosa para comprobar que el RNA no estuviera degradado. Para preparar el gel, se usó el tampón TAE 1x (a partir de una solución en stock 50X, se pesaron 242.28 g de Tris-Base, se agregaron 57.1 ml de ácido acético glacial a 100 ml de una solución 0.5 M EDTA pH 8. Se obtuvo la solución 1X diluyendo) y 1,5% de agarosa, calentando hasta ebullición y después enfriando a temperatura ambiente bajo un chorro de agua fría. Se le añadieron 5 µl de bromuro de etidio marca Applichem y se preparó la infraestructura del gel con las barreras y el peine, dejando que polimerizara la solución. Se cargaron los pocillos con 5 µl de muestra y 1 µl de Gel Loading Dye #B70215 6x, utilizando como marcador 0.5-10 Kb RNA Ladder 75 µg de Invitrogen.



A partir de los datos de Nanodrop se calculó la concentración de RNA modelo para cada muestra, para partir de una misma relación de cDNA en todos los casos. La mezcla se incubó durante 2 minutos a 37°C en el Termomixer previamente calentado. Después, se dejó enfriar en hielo, para hacer otro spin y se añadió al mismo tubo 4 µl de 5x *Reaction Mix*, 2 µl de *Maxima Enzyme Mix* y 4 µl de agua libre de nucleasas.

El contenido se mezcló suavemente y se hizo una centrifugación. Las muestras se introdujeron en el termociclador Mastercycler Personal con el programa Máxima, incubando las soluciones 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C.

### 3.10.4 qPCR

Para la qPCR se utilizó el dispositivo 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystem. En una placa multipocillo de la marca Axygen se hicieron 3 réplicas por condición utilizada, añadiendo a cada pocillo 0.5 µl de cDNA, 0.5 µl de primer directo, 0.5 µl del primer reverso, 2 µl del Mix (5x PyroTaq EvaGreen Qpcr Mix Plus) y 6.5 µl de agua, llegando a un volumen de 10 µl. Los parámetros de la amplificación fueron: 5 minutos a 95°, 40 ciclos que consisten en 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. La reacción se finaliza con un paso de 15 segundos a 95°C.

Para el cálculo de la expresión relativa, se utilizó la fórmula:

$$\text{Log}_2 (P_0/R_0) = -\Delta\text{Ct}$$

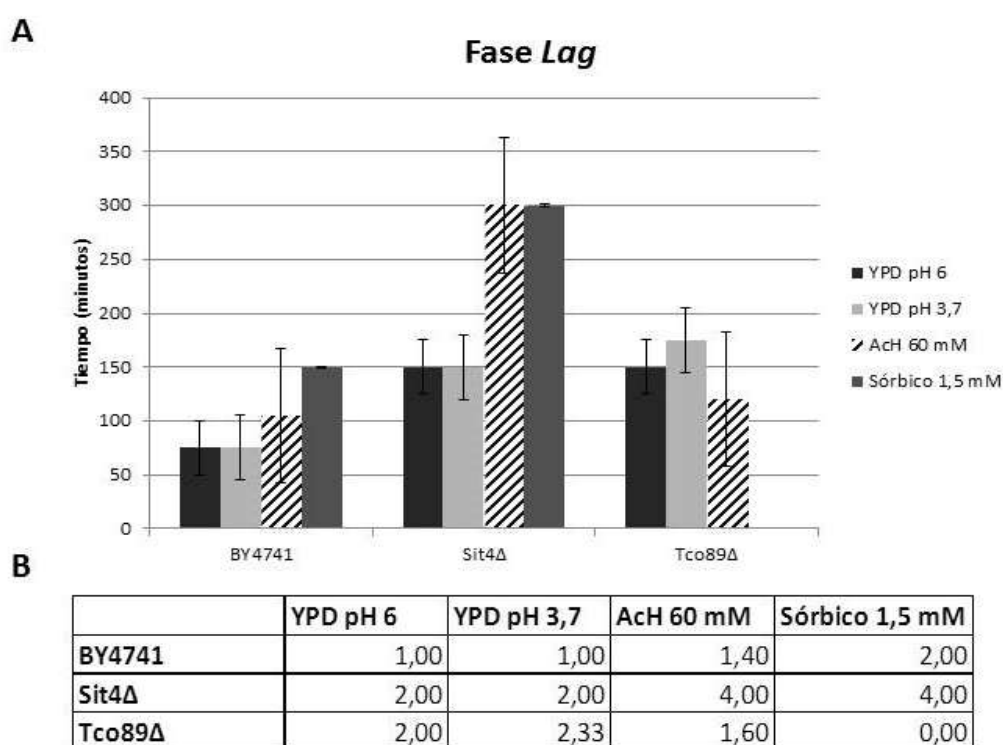
donde  $P_0$  es la cantidad de un mRNA concreto que queremos cuantificar en la muestra antes de la amplificación;  $R_0$  corresponde al mismo parámetro para el gen de referencia y  $\Delta\text{Ct}$  es la diferencia en el número de ciclos del umbral de detección entre el gen de interés y el de referencia.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Comparación de los perfiles de crecimiento de las cepas de interés ante la presencia de ácidos débiles

Se quiso determinar cómo influyen los ácidos débiles en el crecimiento celular de cepas con pérdida y ganancia de función de genes determinados. Se llevó a cabo un estudio del crecimiento mediante un análisis Bioscreen, donde la medida simultánea de la turbidez en pocillos con las cepas de interés permitió obtener los parámetros de crecimiento. Se analizaron como parámetros determinantes la velocidad de crecimiento, el rendimiento y la duración de la fase *Lag*, siguiendo las aproximaciones explicadas en el apartado 3.5 de Materiales y métodos.

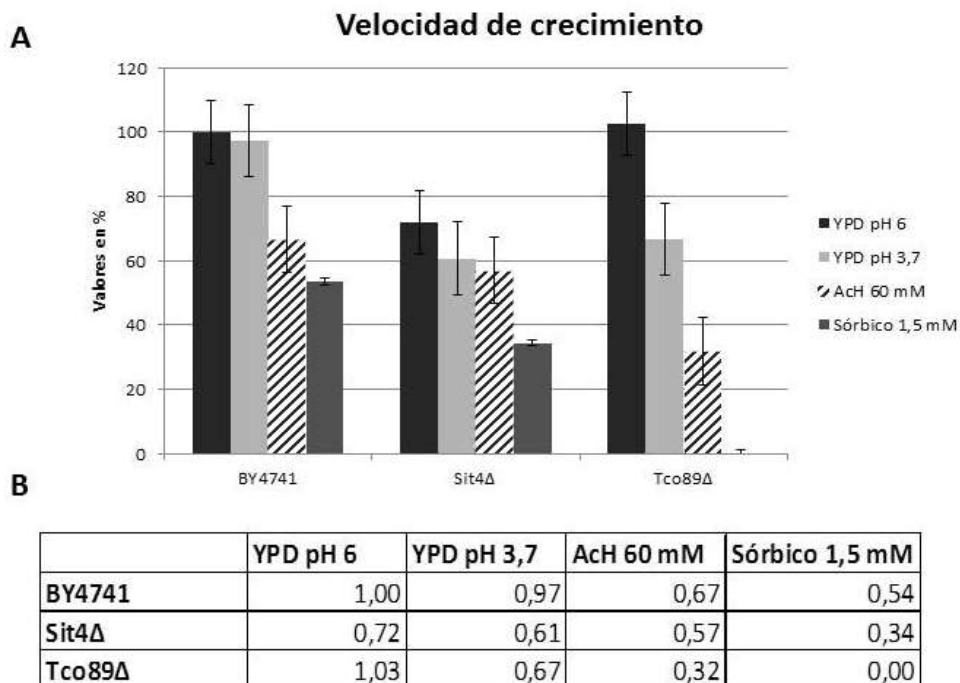
Se analizaron cuatro condiciones en dos conjuntos de cepas. Por una parte se estudió BY4741, *sit4Δ* y *tco89Δ*. Se quiso determinar cómo la ausencia de los genes deletados afectaba al crecimiento en medio rico. Por otro lado se estudiaron las cepas BY4741+p987, BY4741 +p987-*SSD1-V*, RS132 + p987 y RS132 + p987-*SSD1-V*. Esto sirvió para determinar qué efectos tiene la sobreexpresión del gen *SSD1* en ambas cepas silvestres. Las cuatro condiciones testadas fueron: medio YPD a pH 6, para ver las diferencias que existen entre las cepas sólo por la ausencia de los genes deletados; medio YPD a pH 3.7, para conseguir una acidificación del entorno extracelular y el tratamiento con ácido acético 60 mM y con ácido sórbico 1.5 mM.



**Figura 7. Datos de la duración de la fase *Lag* de las cepas BY4741, *sit4Δ* y *tco89Δ* en las cuatro condiciones descritas.** (A) Diagrama de barras con los valores en minutos. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 en YPD pH 6.

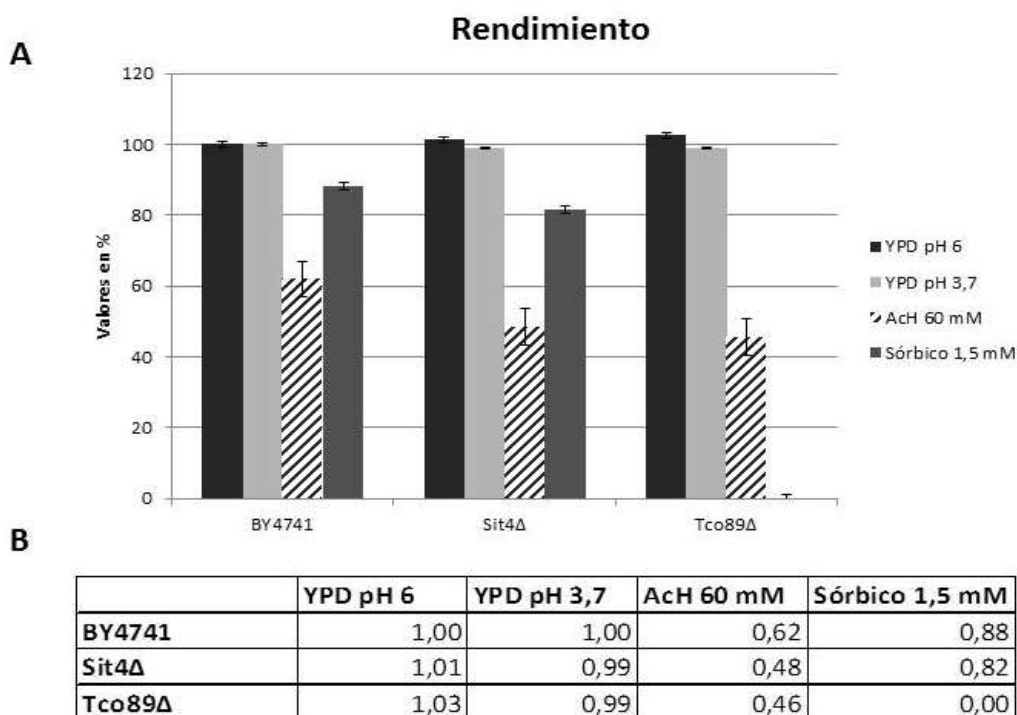
Para el primer conjunto de cepa se observó que tanto *sit4Δ* como *tco89Δ* ya presentan defectos en el crecimiento en medio rico YPD pH 6. La duración de su fase *Lag* era del orden del doble comparada con la cepa silvestre (Figura 7B). El crecimiento en YPD a pH 3.7 no afectó al parámetro de la fase *Lag* ni en la cepa BY4741 ni en el mutante *sit4Δ*, pero se observó

ligeramente aumentada en *tco89Δ*. La presencia de ácidos débiles afectó al crecimiento de todas las cepas negativamente. En primer lugar, la cepa *tco89Δ* no fue capaz de crecer en ácido sórbico 1.5 mM. *Sit4Δ* presentó una duplicación del tiempo de la fase *Lag* bajo el suministro de ambos ácidos, siendo la cepa más afectada en este parámetro. Sin embargo, *tco89Δ* presentó una disminución del 20% en presencia de ácido acético 60 mM (Figura 7B).



**Figura 8. Datos de la velocidad de crecimiento en porcentaje de las cepas BY4741, *sit4Δ* y *tco89Δ* en las cuatro condiciones descritas.** (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 en YPD pH 6.

En cuanto a la velocidad de crecimiento, se pudo observar que la cepa *sit4Δ* en medio rico es la cepa más afectada: presenta una reducción del 28% respecto a la cepa silvestre. El crecimiento en YPD a pH 3.7 redujo ligeramente la velocidad de crecimiento en las cepas BY4741 y *sit4Δ*, pero en *tco89Δ* se vio reducida un 36%. Todas las cepas sufrieron una disminución en la velocidad de crecimiento tras el tratamiento con ácidos débiles, siendo esta más drástica con ácido sórbico (Figura 8A). *Tco89Δ* fue la cepa más afectada tras el tratamiento con ácidos: su velocidad de crecimiento se vio reducida en un 71% en ácido acético y no fue posible su crecimiento en ácido sórbico. En *sit4Δ*, la exposición a ácido acético no redujo apenas su velocidad de crecimiento, al contrario que con ácido sórbico, que se vio reducida un 47%.

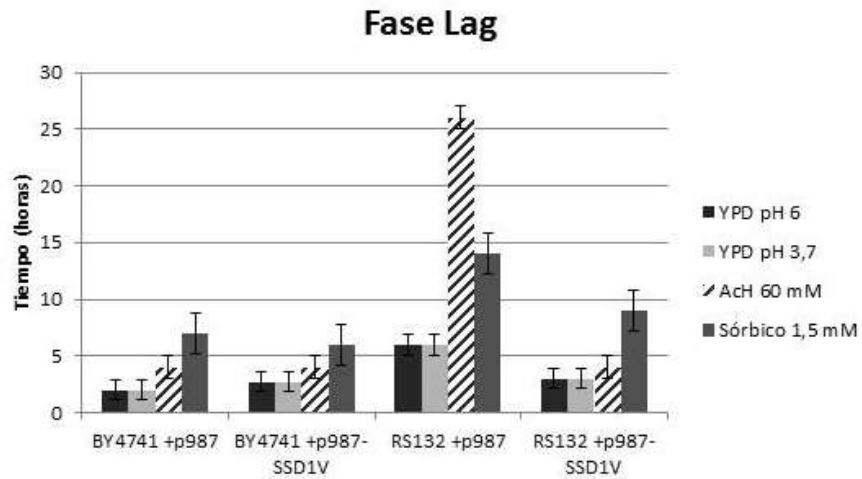


**Figura 9. Datos del rendimiento en porcentaje de las cepas BY4741, *sit4Δ* y *tco89Δ* en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 en YPD pH 6.**

Las cepas llegaron al mismo valor de rendimiento al crecer en medio YPD pH 6 y este valor no se vio afectado cuando las cepas se incubaron en medio YPD a pH 3.7 (Figura 9A). Los valores para el rendimiento se vieron reducidos tras el tratamiento con ácido acético en un 38, 53 y 57% para BY4741, *sit4Δ* y *tco89Δ*, respectivamente. Se evidenció que *tco89Δ* era, de nuevo, la cepa más afectada por la presencia de ácidos débiles en este parámetro. Este mutante presentó una reducción mayor del rendimiento en ambos ácidos, no pudiendo crecer en ácido sórbico a la concentración suministrada. Para las otras dos cepas, el rendimiento en presencia de ácido sórbico no se vio afectado excesivamente, reduciéndose un 12% en la cepa BY4741 y un 18% en el mutante *sit4Δ*.

Se llevó a cabo un segundo experimento analizando los perfiles de crecimiento del otro conjunto de cepas: BY4741+p987, BY4741 +p987-*SSD1-V*, RS132 + p987 y RS132 + p987-*SSD1-V*. Para la duración de la fase *Lag*, se determinó que las cepas BY4741 con el plásmido p987 vacío y BY4741 con el plásmido p987 y una copia más del gen *SSD1* compartían una conducta muy similar (Figura 10A). No se apreciaron diferencias en cuanto al crecimiento en medio YPD pH 6 y pH 3.7 para una misma cepa. Ambas cepas RS132 reportaron una mayor duración de la fase *Lag* en ausencia de ácidos débiles. Mientras que la cepa RS132+p987-*SSD1-V* genera un aumento de 1.5 con respecto a BY4741+p987, RS132+p987 tenía un aumento del orden de 3 (Figura 10B). Todas las cepas se vieron afectadas por la presencia de ácidos débiles, aumentando la duración de la fase *Lag*. La más afectada fue RS132+p987. Esta cepa aumentó su fase *Lag* 4 veces en presencia de ácido acético y 2 veces con ácido sórbico. Sin embargo, RS132 con presencia del alelo *SSD1-V* fue la cepa menos afectada por el estrés ácido, puesto que el incremento que sufría en la duración de la fase *Lag* era menor que el de la cepa BY4741+p987.

**A**

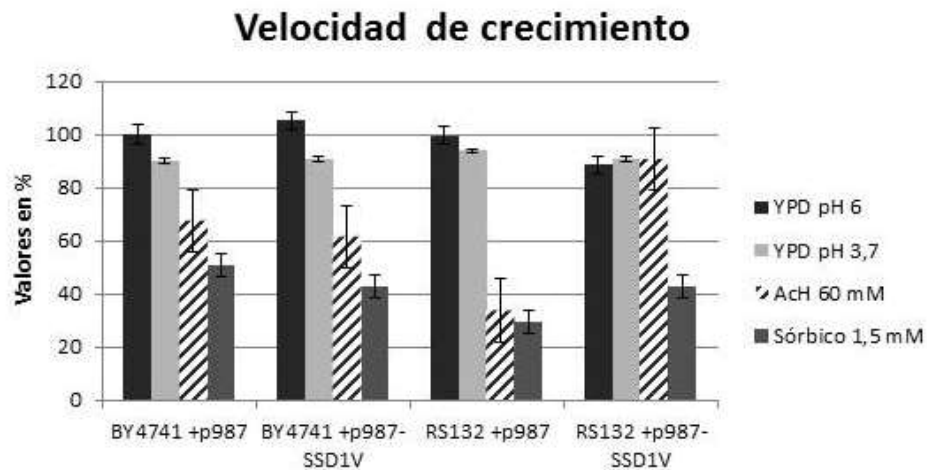


**B**

	YPD pH 6	YPD pH 3,7	AcH 60 mM	Sórbito 1,5 mM
BY4741 +p987	1.00	1.00	2.00	3.50
BY4741 +p987-SSD1V	1.38	1.38	2.00	3.00
RS132 +p987	3.00	3.00	13.00	7.00
RS132 +p987-SSD1V	1.50	1.50	2.00	4.50

Figura 10. Datos de la duración de la fase *Lag* de las cepas BY4741 + p987, BY4741 +p987-SSD1-V, RS132 + p987 y RS132 + p987-SSD1-V en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en horas. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 + p987 en YPD pH 6.

**A**

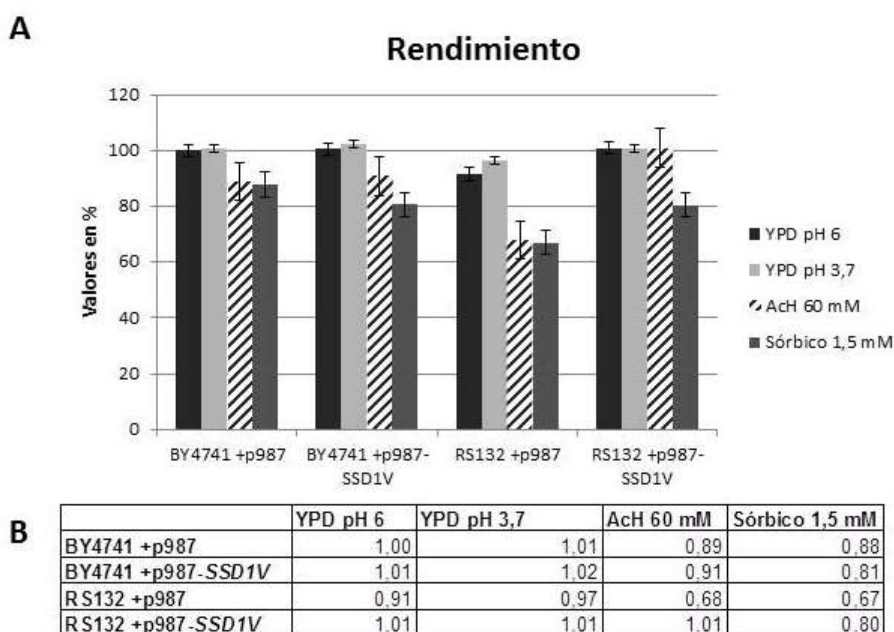


**B**

	YPD pH 6	YPD pH 3,7	AcH 60 mM	Sórbito 1,5 mM
BY4741 +p987	1.00	0.90	0.68	0.51
BY4741 +p987-SSD1V	1.05	0.91	0.61	0.43
RS132 +p987	1.00	0.94	0.34	0.30
RS132 +p987-SSD1V	0.89	0.91	0.91	0.43

Figura 11. Datos de la velocidad de crecimiento en porcentaje de las cepas BY4741 + p987, BY4741 +p987-SSD1-V, RS132 + p987 y RS132 + p987-SSD1-V en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 + p987 en YPD pH 6.

No se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las cepas en medio YPD pH 6, aunque la cepa RS132+p987-SSD1-V vio reducida su velocidad de crecimiento en un 11% comparada con BY4741+p987 (Figura 11B). Se vio que en medio YPD a pH 3.7 la velocidad de crecimiento se veía ligeramente reducida en todos los casos, exceptuando a la cepa RS132-p987-SSD1-V. La presencia de ácidos débiles afectó a todas las cepas, siendo RS132-p987 la más afectada. Esta cepa presentó una reducción del 70% de su velocidad de crecimiento, con ambos ácidos débiles. Se constató que las cepas BY4741+p987 y BY4741+p987-SSD1-V presentan un comportamiento muy parecido. La presencia de una copia más de *SSD1* en BY4741 no afecta a la velocidad de crecimiento. Sin embargo, la sobreexpresión de *SSD1* en la cepa RS132, que tiene naturalmente el alelo de este gen truncado, no sufrió déficits en la velocidad de crecimiento bajo la presencia de ácido acético (Figura 11A). Y la disminución de la velocidad por ácido sórbico fue del mismo orden que la cepa control BY4741+p987.



**Figura 12. Datos del rendimiento en porcentaje de las cepas BY4741 + p987, BY4741 +p987-SSD1, RS132 + p987 y RS132 + p987-SSD1-V en las cuatro condiciones descritas. (A) Diagrama de barras con los valores en porcentaje. (B) Valores numéricos obtenidos de la comparación de las cepas analizadas con el valor obtenido en la cepa BY4741 + p987 en YPD pH 6.**

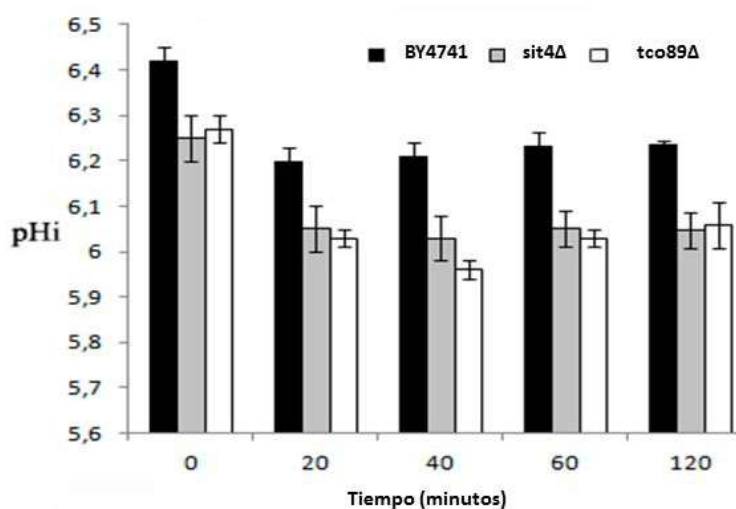
Se vio que el rendimiento no reportó diferencias entre las cuatro cepas y tampoco el crecimiento en medio YPD pH 3.7. La cepa más afectada por la presencia de ácidos débiles fue RS132-p987, con una disminución del rendimiento del 35% con ambos ácidos (Figura 12B). Al igual que en la velocidad de crecimiento, la sobreexpresión del alelo *SSD1* implica un mejor rendimiento de la cepa RS132. El rendimiento de RS132+p987-SSD1-V no se vio afectado por la presencia de ácido acético y la reducción que sufre con ácido sórbico es del mismo orden que para las cepas BY4741. No se reportaron diferencias significativas entre las cepas BY4741+p987 y BY4741+p987-SSD1-V.

## 4.2 Valores de $pH_i$ en presencia y ausencia de ácidos débiles

La presencia de ácidos débiles influye tanto en el crecimiento como en la regulación del pH y su valor intracelular. Es por ello que se quisieron estudiar los valores del  $pH_i$  antes y después del tratamiento con ácidos débiles mediante la medida con  $^{14}C$ -propiónico, tal como se explica en el apartado 3.6 de Materiales y métodos. Se utilizaron las cepas BY4741 (control silvestre), *sit4Δ*, *tco89Δ* y *ssd1Δ*.

En un primer contacto se analizaron los valores del  $pH_i$  de la cepa BY4741. Se quiso comprobar si el tiempo de incubación con el ácido débil influye en el valor del  $pH_i$  final. Las muestras se procesaron antes y después del tratamiento con ácido acético a los 20 minutos, a los 40, a la hora y a las 2 horas. Se comprobó que las diferencias obtenidas en los valores del  $pH_i$  dependen de la  $pK_a$  del ácido débil y del valor del  $pH_e$  del medio y no del tiempo de contacto entre las células y el ácido débil. Se constató también que hay diferencias en la medida de radioactividad dependiendo del tiempo de incubación con el líquido de centelleo OptiPhase HiSafe 3, Liquid scintillation cocktail. Se observó que los valores de las cpm (cuentas por minuto) obtenidas a los 15 minutos de actuación son más bajas y más dispares entre las réplicas. Sin embargo, a las 4 horas, los valores eran más altos y la disparidad entre las réplicas se redujo, por lo que todas las medidas posteriores fueron analizadas a las 4 horas de incubación con el líquido de centelleo.

Se llevó a cabo un ensayo en el que se procesaron las cepas BY4741, *sit4Δ*, *tco89Δ* y *ssd1Δ* con suministro de ácido acético 60 mM durante 20 minutos. Posteriormente se eliminó del estudio la cepa *ssd1Δ* porque tenía un comportamiento muy similar a la cepa silvestre.



**Figura 13. Cinética de valores de  $pH_i$  en las cepas BY4741, *sit4Δ* y *tco89Δ* en presencia/ausencia de ácido acético 60mM.** Los datos son el resultado de dos réplicas técnicas. Ya en medio rico existe una diferencia de valores de pH intracelular en las cepas con pérdida de función, teniendo un valor de  $pH_i$  más bajo, que se acentúa conforme aumenta el tiempo de contacto con el ácido acético.

Los resultados de la Figura 13 corroboraron que tanto la cepa mutante *sit4Δ* como *tco89Δ* tienen un valor de  $pH_i$  más ácido que la cepa silvestre en medio YPD. Se observó que esta diferencia ya existía sin presencia de ácido débil. Tras la exposición a ácido acético durante 20 minutos, los valores del  $pH_i$  de todas las cepas se vieron reducidos, y estos permanecieron prácticamente inmutables con el tiempo de exposición. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que Sit4 y Tco89 son proteínas que participan en la homeostasis del  $pH_i$  ya que la ausencia de estos genes causa una regulación menos eficiente del  $pH_i$ .

Paralelamente a estos experimentos, se quiso estudiar cómo influye el entorno extracelular en los valores del  $pH_i$ . Para ello se incubaron la cepa BY4741 y la cepa mutante *sit4Δ* en YPD a pH 3.7 y pH 4.7, lo que generaría un entorno de  $pH_e$  de 4 y 5 respectivamente en medio YPD. Las medidas se tomaron antes y 20 minutos después del suministro de ácido acético. Los resultados mostraron que el valor del  $pH_i$  no varía en las dos condiciones. Se evidenció que la variación de 1 punto del pH en el rango de pH óptimo para levadura (pH 4-6), no presenta variaciones en el  $pH_i$ .

### **4.3 Influencia de la presencia/ausencia de glucosa sobre la fosforilación del residuo Ser507 de Pma1 y efecto de la delección de *SIT4*.**

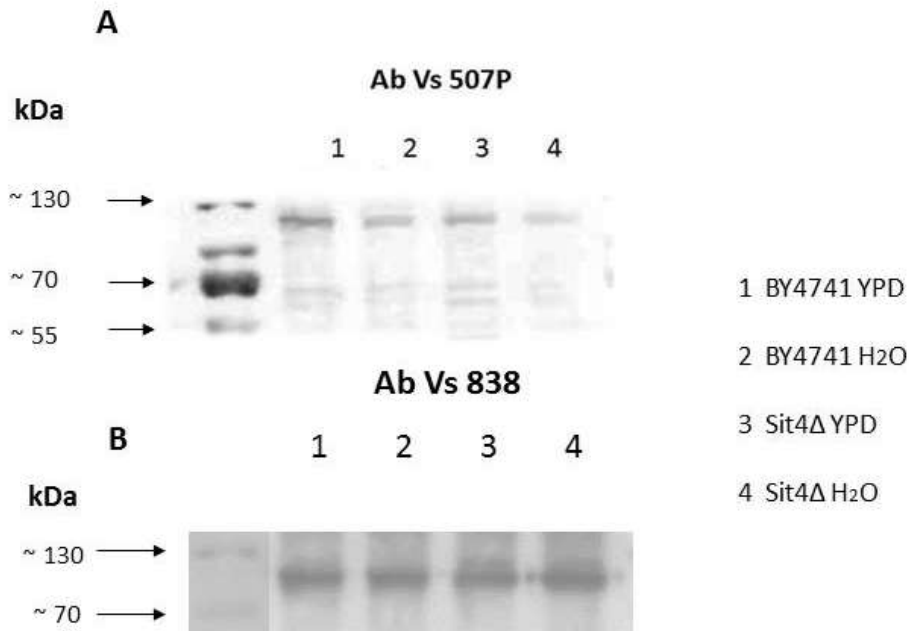
Para el análisis de la regulación de la bomba de protones Pma1 se estudió por un lado el efecto de la presencia-ausencia de glucosa sobre la fosforilación del sitio de regulación Ser507 y por otro lado, se compararon las cepas BY4741 y *sit4Δ* para entender el papel que juega la fosfatasa Sit4 en la fosforilación de la bomba.

Previo a la realización del Western Blot, y debido a que el anticuerpo de reconocimiento del sitio Ser507 tiene una eficiencia de unión desconocida, se efectuó un análisis Dot Blot para comparar la eficacia del anticuerpo y las eventuales diferencias en la señal obtenidas después de la incubación con el anticuerpo secundario en las mismas condiciones. Se analizó el anticuerpo almacenado de tres formas diferentes: tal como llegó en un tampón y a 4°C, precipitado con un volumen de sulfato amónico saturado y a 4°C y finalmente, con glicerol 50% y guardado a -20°C. Se utilizó la misma dilución en los tres métodos (1:10000). La mejor señal se obtuvo con el almacenamiento con sulfato amónico.

Las células fueron crecidas en medio YPD hasta alcanzar la fase exponencial. Seguidamente se separaron dos alícuotas por cada cepa para recrear dos condiciones diferentes: con y sin glucosa. Se coleccionaron las células con un centrífuga de 5 minutos a 4K y se volvieron a resuspender en medio rico (con glucosa) y en agua (sin glucosa), dejando las soluciones 5 minutos en el incubador a 28°C.

Como se puede apreciar en la Figura 14A, se observó una diferencia en la fosforilación del residuo Ser507 de la proteína Pma1 en ambas cepas. La fosforilación en presencia de glucosa es mayor que en el tratamiento sin glucosa. Además, se pudo observar que la fosforilación en *sit4Δ* es menor en comparación a la cepa silvestre, por lo que la ausencia de este gen influye en los niveles de fosforilación de la Ser507. Para el control de carga se realizó un “*stripping*” de la membrana y se usó el anticuerpo de reconocimiento de la proteína completa Pma1. Se pudo evidenciar que la cantidad de proteína era la misma en las cuatro condiciones (Figura 14B)





**Figura 14. Resultados del revelado de la membrana para los sitios Ser507 y el aminoácido 838 de la proteína Pma1.** (A) Anticuerpo contra el sitio Ser507: la fosforilación es mayor en presencia de glucosa en ambas cepas. BY4741 presenta una mayor fosforilación que *sit4Δ*. (B) Misma membrana tras un “stripping” usando un anticuerpo contra el aminoácido 838 de la Pma1 para el control de carga.

Se realizó el mismo experimento utilizando un anticuerpo contra el aminoácido Ser899 fosforilado. Sin embargo se observaron numerosas bandas que no coincidían con el tamaño esperado para Pma1, lo que demostraba su inespecificidad. Además, los resultados no mostraban ninguna diferencia, ni entre las condiciones ni entre las cepas.

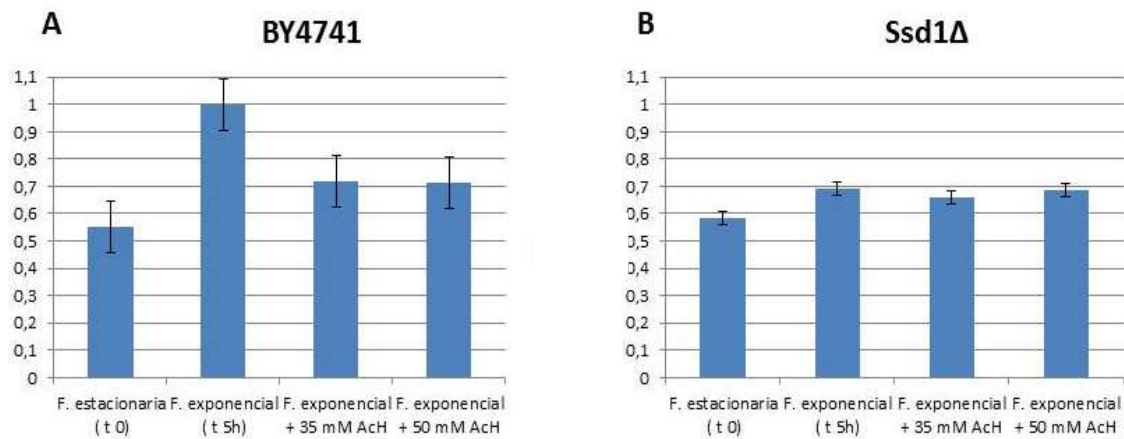
#### 4.4 Concentración del mRNA de *CLN3* en la cepa BY4741 y el mutante *ssd1Δ*.

El estudio se llevó a cabo utilizando la cepa silvestre y el mutante *ssd1Δ* y se estudiaron los niveles de RNA mensajero de la ciclina 3 (gen *CLN3*). La proteína *ssd1* tiene capacidad para unirse a alrededor de 150 mensajeros, entre ellos los correspondientes a las ciclinas. Se quisieron determinar las diferencias en los niveles del mensajero de *CLN3* entre la cepa silvestre y la cepa con pérdida de función en *SSD1*, para comprobar si este gen participa en la regulación de los mensajeros de ciclina y por tanto, en el ciclo celular. Además, como se ha afirmado anteriormente que *SSD1-V* produce tolerancia a acidificación celular, se quiso determinar cómo cambian los niveles de concentración del mensajero de *CLN3* en presencia de ácido acético.

Se realizó un estudio de cinética para determinar cuál es el tiempo necesario para que las células en fase estacionaria volvieran a entrar en el ciclo celular en presencia de ácido acético. Se hicieron pruebas con diferentes concentraciones de ácido acético, eligiéndose las concentraciones 35 y 50 mM y las células se mantuvieron 5 horas en contacto con el ácido acético, para una posterior extracción de RNA.

Para poder comparar los niveles de expresión de *CLN3* se necesitó un gen cuya expresión y concentración de mensajero permaneciera constante en ambas cepas, independientemente de la fase del crecimiento celular y del tratamiento. Fueron testados 4 genes utilizados previamente en el laboratorio y que reportaron buenos resultados: UBC-6,

ACT-1, TPI1 y CCW12. Se llevó a cabo la qPCR con los cebadores de estos genes, eligiéndose el gen CCW12 como control, al proporcionar los resultados más uniformes.



**Figura 15. Niveles de expresión del mensajero de CLN3 en las cepas BY4741 (A) y *ssd1Δ* (B) en cuatro condiciones: células en fase estacionaria con YPD pH 3.7, células incubadas 5 horas con YPD pH 3.7, células incubadas 5 horas con YPD más 35mM y 50mM de ácido acético.**

Como se puede observar en la Figura 15A los niveles de mensajero de *CLN3* en fase estacionaria son más bajos que en fase exponencial, probablemente debido a que el ciclo celular está parado. A las 5 horas de incubación en medio rico, las células vuelven a entrar en el ciclo celular (fase exponencial) y, consecuentemente, el nivel del mensajero de *CLN3* es de 1.8 veces mayor que en fase estacionaria. Sin embargo, en presencia de ácido acético, este aumento es sólo de 1.25 veces. La disminución del aumento es del mismo orden en ambas concentraciones de ácido. Es decir, la acidificación intracelular afecta a la concentración de mensajero de *CLN3* en BY4741 evitando en gran parte el aumento de expresión en fase exponencial respecto a la estacionaria.

Para la cepa *ssd1Δ*, los niveles de expresión no variaron de forma significativa en las cuatro condiciones (Figura 15B). La concentración de mensajeros en fase estacionaria fue igual que en la cepa silvestre y el aumento de expresión en las 3 condiciones restantes con respecto a la fase estacionaria fue mínimo, del orden de 1.2 veces. Por tanto, la ausencia del gen *SSD1* disminuye la concentración de mensajeros de *CLN3* en la fase exponencial, puesto que es un 30% menor en el mutante *ssd1Δ* que en la cepa silvestre.

## 5. DISCUSIÓN

La célula eucariota necesita tener un sistema de homeostasis del pH altamente regulado. La formación eficiente de un gradiente entre el interior y el exterior celular favorece el correcto funcionamiento de diferentes acciones vitales, como el control de la proliferación y el crecimiento celular (Harguindey *et al.*, 2005). Por eso, determinar qué genes están involucrados en la regulación del  $pH_i$  es de vital importancia y tendría aplicación en diferentes campos biomédicos, como el estudio del cáncer. En el presente estudio se quiso determinar cómo afecta al crecimiento la ausencia de los genes *SIT4* y *TOC89*, ya estudiados anteriormente en el laboratorio. *SIT4* codifica una fosfatasa con diana en las serinas/treoninas fosforiladas, implicada en la homeostasis iónica y el cambio de la fase G1 a la S. *TCO89* codifica una subunidad del complejo regulador del crecimiento TORC1, y es un activador del transporte de protones y de potasio (Mahmoud *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las cepas con pérdida de función en estos genes presentan defectos en el crecimiento en medio rico, específicamente una duración de la fase *Lag* del orden del doble con respecto a la cepa silvestre (Figura 7) y *sit4Δ* vio reducida su velocidad de crecimiento en un 30%. En lo referente a ácidos orgánicos, se había descrito que *sit4Δ* era sensible a ácido sórbico (Mollapour *et al.*, 2004), pero nada estaba establecido en cuanto a *tco89Δ*. Tras el estudio del crecimiento mediante el análisis con Bioscreen se determinó que *tco89Δ* es la cepa estudiada más sensible a ácidos débiles y cambios en el pH: en crecimiento con medio YPD a pH 3.7 esta cepa reduce su velocidad de crecimiento un 40%; en presencia de ácido acético 60 mM, la reducción aumenta a un 70% y con ácido sórbico 1.5 mM no es capaz de crecer (Figura 8). La ausencia de *Tco89* y la presencia de ácidos débiles influye negativamente en la actividad de TORC1 y por tanto, en el crecimiento. También se manifestó en los experimentos de medida del  $pH_i$  que las cepas *sit4Δ* y *tco89Δ* tienen un valor de  $pH_i$  más ácido que la cepa silvestre y este valor disminuye al adicionar ácido acético (Figura 13). Por lo tanto, estos genes, además de ser necesarios para el correcto crecimiento de la célula, también son esenciales para la homeostasis del pH.

Paralelamente se obtuvieron los perfiles de crecimiento de otro conjunto de cepas: BY4741+p987, BY4741+p987-*SSD1-V*, RS132+p987, y RS132+p987-*SSD1-V*. Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados para las dos cepas BY4741+p987 y BY4741+p987-*SSD1-V*. Esto confirmó que la presencia de una copia más del gen *SSD1* no reporta ventajas en el crecimiento o en la tolerancia a acidificación (Figuras 10, 11 y 12). Sin embargo, se reportaron diferencias en ambas cepas RS132+p987 y RS132+p987-*SSD1-V*. La cepa más afectada por la acidificación intracelular fue RS132+p987, donde *SSD1* está naturalmente truncado y pierde parte de la secuencia funcional. Esta cepa presentó una reducción del 64% y del 71% en presencia de ácido acético y sórbico, respectivamente (Figura 11). Por otro lado, RS132+p987-*SSD1-V* presentó resistencia a ácido acético: ninguno de los parámetros estudiados se vio alterado en presencia de este ácido. Pero se vio afectado por la presencia de ácido sórbico, aunque presentó reducciones del mismo orden que las dos cepas BY4741. Estos resultados pusieron de manifiesto que la tolerancia a ácido acético se debe a la presencia del alelo funcional más que al número de copias.

Uno de los mayores reguladores del crecimiento en los organismos eucariotas es el complejo TOR, un complejo altamente conservado entre las especies (Dennis, Fumagalli and Thomas, 1999) que regula el crecimiento dependiendo de la disponibilidad de nutrientes. En estudios recientes llevados a cabo en el laboratorio del profesor Ramón Serrano se constató que la bomba de protones *Pma1* está regulada por la acción del complejo TOR, y que esta activación es llevada a cabo a  $pH_i$  altos (Mahmoud *et al.*, 2017). Esta bomba de protones se encarga de crear un gradiente electroquímico del cual dependen numerosas funciones como el

mantenimiento de la homeostasis del pH (Lee et al., 2016). La acción conjunta de TOR y Pma1 regula el crecimiento y la homeostasis del pH de la célula.

La disponibilidad de glucosa es uno de los factores determinantes de la actividad de TORC1 (Reinke et al., 2004) y también de Pma1, aunque TORC1 solo es responsable de la mitad de la actividad de Pma1 durante el crecimiento en glucosa (Mahmoud *et al.*, 2017). Se determinó el nivel de fosforilación de dos aminoácidos reguladores de Pma1: Ser507 y Ser899, porque son dos sitios de fosforilación candidatos para la regulación de Pma1 mediada por TORC1. Los sitios Ser911/Thr912 se dejaron fuera del estudio puesto que, a pesar de ser regulados por el metabolismo de la glucosa, no son regulados por TORC1 (Mahmoud *et al.*, 2017). Por otro lado, la regulación de Pma1 mediada por TORC1 debe ser indirecta. Sit4 es uno de los factores con los que TORC1 interacciona “*dowstream*” (Figura 4). Se planteó la hipótesis de que a través de Sit4, TORC1 regulara la activación de la bomba de protones, por ello el experimento se llevó a cabo en la cepa silvestre y en la cepa mutante *sit4Δ*.

Se pudieron observar diferencias en el nivel de fosforilación en el sitio Ser507, pero no en Ser899. En presencia de glucosa la fosforilación de ambas cepas fue mayor comparada con la misma cepa en ausencia de glucosa (Figura 14A). También se pudo observar una diferencia entre el nivel de fosforilación de BY4741 y *sit4Δ* (Figura 14A), siendo menor en la cepa mutante. Esto confirmó que la disponibilidad de glucosa es uno de los factores reguladores de la fosforilación de Ser507 en Pma1 y parte de ésta también depende de Sit4. Sin embargo, no se pudo confirmar que la proteína fosfatasa Sit4 sea el único factor que utiliza TORC1 en la regulación directa de la bomba de protones.

En anteriores trabajos en el laboratorio del profesor Ramón Serrano se evidenció que el gen *SSD1* otorga tolerancia a estrés ácido en una cepa de laboratorio que tiene un gen no funcional *SSD1-d*. El hecho de que una doble mutación en *SIT4* y *SSD1* resulte letal para la célula (Ohyama, *et al.*, 2010) y que ambas proteínas interaccionen con TORC1, sugiere que tienen una función parcialmente redundante. *Ssd1* tiene un dominio de unión a mRNA y se puede unir a más de 150 mRNA, entre ellos los mensajeros de las ciclinas G1 (Ohyama, *et al.*, 2010). Se planteó la hipótesis de que este gen estuviera implicado en la regulación del ciclo celular, explicándose así por qué otorga tolerancia a estrés ácido. Para demostrarlo se midió la concentración de los mensajeros de la ciclina 3. Se escogió *CLN3* puesto que es una de las primeras ciclinas que participan en la progresión del ciclo y regula otras ciclinas de la fase G1 (Rowicka et al., 2007). El experimento se llevó a cabo en la cepa silvestre BY4741 y en la cepa con pérdida de función para el gen *SSD1*. Se pudo observar que los mensajeros de *CLN3* en la cepa BY4741 responden negativamente a la presencia de ácidos débiles como el ácido acético puesto que su concentración disminuye en contacto con estos (Figura 15A). Sin embargo, las diferencias en el nivel de concentración que se dan en BY4741 no se observan en *ssd1Δ*. En fase exponencial en medio rico YPD pH 3.7, la concentración de mensajeros de *CLN3* en *ssd1Δ* es un 30% menor que en la cepa silvestre. Se llegó a la conclusión que para la correcta acumulación de mensajero de *CLN3* es necesario el gen *SSD1*. Recientemente se ha confirmado que *Ssd1* tiene capacidad para unirse a la región 5'-UTR del mensajero de *CLN2*, estabilizándolo. Para una mejor comprensión de la función de *Ssd1* se precisaría analizar la expresión de *CLN2* (Ohyama et al., 2010) en las dos cepas utilizadas, pudiéndose ahondar más en el papel que juega *Ssd1* en la regulación del ciclo celular.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los experimentos razonados se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La cepa *tco89Δ*, en la que se encuentra deletada una subunidad de TORC1, es sensible a ácidos débiles: es incapaz de crecer ante la exposición de ácido sórbico a la concentración suministrada y su velocidad de crecimiento, así como el rendimiento, se ven drásticamente reducidos ante la exposición con ácido acético.
- La presencia del alelo *SSD1-V* produce tolerancia a ácido acético y reduce los efectos negativos producidos por el crecimiento con ácido sórbico en la cepa de laboratorio RS132, que contienen el alelo *SSD1-d*.
- Las cepas *sit4Δ* y *tco89Δ* tienen una deficiencia en la regulación de la homeostasis del pH ante la exposición de ácidos débiles.
- La presencia de glucosa es uno de los factores concluyentes de la fosforilación del aminoácido Ser507 en Pma1 y por tanto, determinante en la regulación de esta bomba de protones. La presencia de la fosfatasa Sit4 influye en el nivel de fosforilación del sitio Ser507 de Pma1, pudiendo ser otro de los factores reguladores.
- La presencia del alelo *SSD1-V* es necesaria para la máxima expresión de *CLN3* en fase exponencial, pero no en fase estacionaria o en medio con ácido acético, que acidifica el interior de las células.
- Finalmente, este trabajo ha aportado evidencia inicial sobre las hipótesis de partida: 1) hay una correlación entre el crecimiento y el pH intracelular; 2) la glucosa aumenta la fosforilación de Ser507; 3) Ssd1 reduce los niveles de mRNA de *CLN3* durante el estrés ácido intracelular.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ANGELES DE LA TORRE-RUIZ, M. (2002). Sit4 Is Required for Proper Modulation of the Biological Functions Mediated by Pkc1 and the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp.33468-33476.

ARNDT, K., STYLES, C. AND FINK, G. (1989). A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell*, 56(4), pp.527-537.

BAKER BRACHMANN, C., DAVIES, A., COST, G., CAPUTO, E., LI, J., HIETER, P. AND BOEKE, J. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2), pp.115-132.

BERNABEU LORENZO, M (2015). Aumento de dosis génica de los genes DPL1, SSD1 y SRP101 en *Saccharomyces cerevisiae* y fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular. <https://riunet.upv.es/handle/10251/54365>

CALDERON-MONTANO JM, BURGOS-MORON E, PEREZ-GUERRERO C, SALVADOR J, ROBLES A, LOPEZ-LAZARO M. Role of the intracellular pH in the metabolic switch between oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis - relevance to cancer. *WebmedCentral Cancer* 2011; 2(3): WMC001716.

CAMPETELLI, A., PREVITALI, G., ARCE, C., BARRA, H. AND CASALE, C. (2005). Activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H<sup>+</sup>-ATPase-acetylated tubulin complex. *FEBS Journal*, 272(22), pp.5742-5752.

CARDONE, R., CASAVOLA, V. AND RESHKIN, S. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 5(10), pp.786-795.

COLOMINA, N., FERREZUELO, F., VERGÉS, E., ALDEA, M. AND GARÍ, E. (2009). Whi3 regulates morphogenesis in budding yeast by enhancing Cdk functions in apical growth. *Cell Cycle*, 8(12), pp.1912-1920.

CUNNINGHAM, K. (2011). Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium*, 50(2), pp.129-138.

DENNIS, P., FUMAGALLI, S. AND THOMAS, G. (1999). Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1), pp.49-54.

DI COMO, C. AND ARNDT, K. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development*, 10(15), pp.1904-1916.

GARÍ E, VOLPE T, WANG H, GALLEGRO C, FUTCHER B, ALDEA M. (2001) Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev* 15(21):2803-2808.

GIAEVER, G. AND NISLOW, C. (2014). The Yeast Deletion Collection: A Decade of Functional Genomics. *Genetics*, 197(2), pp.451-465.

HARGUINDEY, S., ORIVE, G., LUIS PEDRAZ, J., PARADISO, A. AND RESHKIN, S. (2005). The role of pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two

faces of the same coin—one single nature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1756(1), pp.1-24.

HELLIWELL, S., WAGNER, P., KUNZ, J., DEUTER-REINHARD, M., HENRIQUEZ, R. AND HALL, M. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 5(1), pp.105-118.

HOGAN, D.J., RIORDAN, D.P., GERBER, A.P., HERSCHLAG, D., AND BROWN, P.O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* 6: e255.

INOKI, K., OUYANG, H., LI, Y. AND GUAN, K. (2005). Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), pp.79-100.

JABLONKA, W., GUZMÁN, S., RAMÍREZ, J. AND MONTERO-LOMELÍ, M. (2006). Deviation of carbohydrate metabolism by the SIT4 phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(8), pp.1281-1291.

JACINTO, E., GUO, B., ARNDT, K., SCHMELZLE, T. AND HALL, M. (2001). TIP41 Interacts with TAP42 and Negatively Regulates the TOR Signaling Pathway. *Molecular Cell*, 8(5), pp.1017-1026.

JANSEN, J., WANLESS, A., SEIDEL, C. AND WEISS, E. (2009). Cbk1 Regulation of the RNA-Binding Protein Ssd1 Integrates Cell Fate with Translational Control. *Current Biology*, 19(24), pp.2114-2120.

JANSSENS, V. AND GORIS J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 2001; 353:417-439

J. RESHKIN, S., A. CARDONE, R. AND HARGUINDEY, S. (2012). Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger, pH Regulation and Cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8(1), pp.85-99.

KÜHLBRANDT, W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), pp.282-295.

KURISCHKO, C., KIM, H., KURAVI, V., PRATZKA, J. AND LUCA, F. (2011). The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *The Journal of Cell Biology*, 192(4), pp.583-598.

KURISCHKO, C., KURAVI, V., HERBERT, C. AND LUCA, F. (2011). Nucleocytoplasmic shuttling of Ssd1 defines the destiny of its bound mRNAs. *Molecular Microbiology*, 81(3), pp.831-849.

LECCHI, S., NELSON, C., ALLEN, K., SWANEY, D., THOMPSON, K., COON, J., SUSSMAN, M. AND SLAYMAN, C. (2007). Tandem Phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C Terminus of Yeast Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Leads to Glucose-dependent Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), pp.35471-35481.

LEE, Y., NASUTION, O., LEE, Y., KIM, E., CHOI, W. AND KIM, W. (2016). Overexpression of PMA1 enhances tolerance to various types of stress and constitutively activates the SAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), pp.229-239.

LEE, Y., NASUTION, O., CHOI, E., CHOI, I., KIM, W. AND CHOI, W. (2015). Transcriptome analysis of acetic-acid-treated yeast cells identifies a large set of genes whose overexpression or

deletion enhances acetic acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), pp.6391-6403.

LUDOVICO, P., LEÃO, C., SOUSA, M., CÔRTE-REAL, M. AND SILVA, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147(9), pp.2409-2415.

LUTSENKO, S. AND KAPLAN, J. (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry*, 34(48), pp.15607-15613.

MADRID, R., GÓMEZ, MJ., RAMOS, J., RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Bio. Chem.* 273: 14838-14844.

MAHMOUD, S., PLANES, M., CABEDO, M., TRUJILLO, C., RIENZO, A., CABALLERO-MOLADA, M., SHARMA, S., MONTESINOS, C., MULET, J. AND SERRANO, R. (2017). TOR complex 1 regulates the yeast plasma membrane proton pump and pH and potassium homeostasis. *FEBS Letters*.

MASUDA, C., RAMIREZ, J., PENA, A. AND MONTERO-LOMELI, M. (2000). Regulation of Monovalent Ion Homeostasis and pH by the Ser-Thr Protein Phosphatase SIT4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), pp.30957-30961.

MAZÓN, M., ERASO, P. AND PORTILLO, F. (2015). Specific phosphoantibodies reveal two phosphorylation sites in yeast Pma1 in response to glucose. *FEMS Yeast Research*, 15(5), p.fov030.

MILLER, M. AND CROSS, F. (2001). Mechanisms Controlling Subcellular Localization of the G1 Cyclins Cln2p and Cln3p in Budding Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), pp.6292-6311.

MIR, S., FIEDLER, D. AND CASHIKAR, A. (2008). Ssd1 Is Required for Thermotolerance and Hsp104-Mediated Protein Disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), pp.187-200.

MOLLINEDO, F. (2012). Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Frontiers in Oncology*, 2.

MOLLAPOUR, M., FONG, D., BALAKRISHNAN, K., HARRIS, N., THOMPSON, S., SCHÜLLER, C., KUCHLER, K. AND PIPER, P. (2004). Screening the yeast deletion mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast*, 21(11), pp.927-946.

PALMQVIST, E., GRAGE, H., MEINANDER, N. AND HAHN-HÄGERDAL, B. (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(1), pp.46-55.

PAMPULHA, M. AND LOUREIRO, V. (1989). Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 11(4), pp.269-274.

PARVIZ F, HALL DD, MARKKWARDT DD, HEIDEMAN W (1998) Transcriptional regulation of CLN3 expression by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180(17):4508-4515.



- PHATNANI, H., JONES, J. AND GREENLEAF, A. (2004). Expanding the Functional Repertoire of CTD Kinase I and RNA Polymerase II: Novel PhosphoCTD-Associating Proteins in the Yeast Proteome†. *Biochemistry*, 43(50), pp.15702-15719.
- PINTO, I., CARDOSO, H., LEÃO, C. AND VAN UDEN, N. (1989). High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(10), pp.1350-1352.
- PRIMO, C., FERRI-BLÁZQUEZ, A., LOEWITH, R. AND YENUSH, L. (2016). Reciprocal Regulation of Target of Rapamycin Complex 1 and Potassium Accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(2), pp.563-574.
- RAO, R., DRUMMOND-BARBOSA, D. AND SLAYMAN, C. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast*, 9(10), pp.1075-1084.
- OHYAMA, Y., KASAHARA, K. AND KOKUBO, T. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Ssd1p promotes CLN2 expression by binding to the 5'-untranslated region of CLN2 mRNA. *Genes to Cells*, 15(12), pp.1169-1188.
- RACKI, W.J., BECAM, A.M., NASR, F., AND HERBERT, C.J. (2000) Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19: 4524–4532.
- RAO, R., DRUMMOND-BARBOSA, D. AND SLAYMAN, C. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast*, 9(10), pp.1075-1084.
- REINKE, A., ANDERSON, S., MCCAFFERY, J., YATES, J., ARONOVA, S., CHU, S., FAIRCLOUGH, S., IVERSON, C., WEDAMAN, K. AND POWERS, T. (2004). TOR Complex 1 Includes a Novel Component, Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), pp.14752-14762.
- RESHKIN, S. (2000). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *The FASEB Journal*, 14(14), pp.2185-2197.
- RESHKIN, S., GRECO, M. AND CARDONE, R. (2014). Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), pp.20130100-20130100.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1469(1), pp.1-30.
- ROWICKA, M., KUDLICKI, A., TU, B. AND OTWINOWSKI, Z. (2007). High-resolution timing of cell cycle-regulated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), pp.16892-16897.
- SERRANO, R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 947(1), pp.1-28.
- STARK, M. (1996). Yeast Protein Serine/Threonine Phosphatases: Multiple Roles and Diverse Regulation. *Yeast*, 12(16), pp.1647-1675.

- STETTLER, S., CHIANNILKULCHAI, N., HERMANN-LE DENMAT, S., LALO, D., LACROUTE, F., SENTENAC, A., AND THURIAUX, P. (1993) A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 239: 169–176.
- SUTTON, A., IMMANUEL, D. AND ARNDT, K. (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Molecular and Cellular Biology*, 11(4), pp.2133-2148.
- TABANELLI, G., VERARDO, V., PASINI, F., CAVINA, P., LANCIOTTI, R., CABONI, M., GARDINI, F. AND MONTANARI, C. (2016). Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. *Journal of Dairy Science*, 99(1), pp.120-129.
- TORRES, J. (2002). Regulation of the Cell Integrity Pathway by Rapamycin-sensitive TOR Function in Budding Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp.43495-43504.
- TRUJILLO DEL RÍO, C. (2016). Regulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de levadura por la proteína kinasa TOR, la proteína fosfatasa Sit4 y la proteína de unión a RNA Ssd1. <https://riunet.upv.es/handle/10251/69161>
- WANLESS, A., LIN, Y. AND WEISS, E. (2014). Cell Morphogenesis Proteins Are Translationally Controlled through UTRs by the Ndr/LATS Target Ssd1. *PLoS ONE*, 9(1), p.e85212.
- WEINBERGER, M., FENG, L., PAUL, A., SMITH, D., HONTZ, R., SMITH, J., VUJCIC, M., SINGH, K., HUBERMAN, J. AND BURHANS, W. (2007). DNA Replication Stress Is a Determinant of Chronological Lifespan in Budding Yeast. *PLoS ONE*, 2(8), p.e748.
- WEINHOUSE, S., WARBURG, O., BURK, D. and SCHADE, A. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science*, 124(3215), pp.267-272.
- WINZELER, E., LEE, B., McCUSKER, J. and DAVIS, R. (1999). Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology*, 118(7), pp.73-80.