

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas



Regulación de la homeostasis iónica por los complejos
TORC1 y TORC2

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Alumno: Marc Cabedo López

Director: José Miguel Mulet Salort

Codirector: Ramón Serrano Salom

Valencia, Septiembre 2012

Curso 2011-2012

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	1
1.2 Transporte de iones en levadura.....	2
1.3 H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática (Pma1). Función y regulación.....	7
1.4 Ruta TOR.....	10
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Cepas de levadura.....	17
3.2 Medios utilizados.....	18
3.3 Ensayos de crecimiento de colonias de levadura en medio sólido (goteos)..	18
3.4 Determinación de la actividad enzimática de la H ⁺ -ATPasa.....	18
3.5 Determinación del contenido interno de potasio.....	19
3.6 Tinción del citoesqueleto.....	19
RESULTADOS.....	20
4.1 TOR regula Pma1 a nivel de actividad de la proteína.....	20
4.2 Efecto de la regulación de la H ⁺ -ATPasa por parte de TORC1 en la entrada en G ₀	21
4.3 Tco89 relaciona TORC1 y la regulación del potencial de membrana.....	23
4.4 Relación entre TORC2 y el transporte de potasio de alta afinidad.....	26
4.5 Tor2 y el citoesqueleto.....	28
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

INTRODUCCIÓN

La homeostasis de iones intracelular es fundamental para la fisiología de las células. La regulación del flujo de iones es necesaria para mantener la concentración de iones tóxicos baja y para la correcta acumulación de iones esenciales. Las células de hongos y plantas están dotadas de un transporte primario activo mediado por H^+ -ATPasas, y un transporte secundario mediado por canales y co-transportadores, para mantener un adecuado ratio K^+/Na^+ en el citosol. La homeostasis de los iones K^+ y Na^+ es fundamental para la actividad de muchas enzimas y también para otros procesos como el mantenimiento del potencial de membrana y la adecuada turgencia y volumen de la pared celular (Zhu, 2003).

1.1 Levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

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

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

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

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

1.2 Transporte de iones en levadura

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

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

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

Aspectos generales de la homeostasis de cationes de metales alcalinos.

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

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

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

Transporte a nivel de membrana plasmática.

La captación de potasio.

Los genes que codifican los dos transportadores principales implicados en la captación de potasio en *S. cerevisiae* son: *TRK1* y *TRK2* (Gaber *et al.*, 1988, Ko *et al.*, 1990). *TRK1* (YJL129c) fue el primer gen aislado y estudiado que codifica un transportador de K^+ en células eucariotas y fue clonado gracias a su capacidad para suprimir el defecto del transporte de potasio en células mutantes en *TRK1* en levadura. *TRK1* codifica una proteína de membrana de 180 KDa, constituida por 1235 aminoácidos, para los cuales el análisis de hidrofobicidad predice 12 dominios que atraviesan la membrana (Gaber *et al.*, 1988). Más tarde fueron identificados ortólogos de *TRK1* en otras levaduras, hongos y plantas superiores (Rodríguez-Navarro, 2000). Trk1 (Fig. 1), es una proteína integral de la membrana plasmática localizada en unos dominios enriquecidos con glicolípidos formando una plataforma para el transporte de lípidos y proteínas.

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

TRK2 (YKR050w) es el segundo gen *TRK* en *S. cerevisiae*. Codifica una proteína más corta (889 aminoácidos) y un 55% de identidad con Trk1 en su secuencia. También contiene 12 supuestos dominios transmembrana (Ko *et al.*, 1990), cuya identidad a los de Trk1 se eleva al 70- 90%. La diferencia principal entre las proteínas Trk1 y Trk2 se encuentra entre el primer y el segundo dominio. En Trk1, el bucle contiene 642 aminoácidos mientras que en Trk2 el segmento intracelular es mucho más corto (326 aminoácidos). Curiosamente, la mayoría de los genes identificados en otras Trk de levaduras están más estrechamente relacionados con *TRK2* que con *TRK1*.

Existe una relación entre los genes *TRK* y los diferentes tipos de transporte de potasio. En una cepa silvestre, la mayoría de los flujos de potasio están mediados por *TRK1*, el

cual puede trabajar como un transportador de alta o baja afinidad en función de las condiciones de crecimiento y el estado de potasio de la célula. Así, las células silvestres con crecimiento sin limitaciones de potasio mostrarían el transporte de baja afinidad, pero después de un ayuno de este elemento activan los sistemas de alta afinidad. *TRK2* puede transportar también potasio con una alta afinidad, pero este gen está muy poco expresado en condiciones normales. Su actividad se ve afectada por la presencia de *TRK1*. Finalmente, en cepas que carecen de los dos transportadores, se hace evidente la existencia de un transporte de potasio ectópico de baja afinidad (Madrid *et al.*, 1998).

Junto con el sistema de transporte de potasio dependiente de *TRK*, existe un sistema de transporte de baja afinidad denominado NSC1 (canal inespecífico de cationes) (Fig. 1). Este transporte fue identificado a nivel electrofisiológico en células mutantes para los genes *TRK1* y *TRK2*. El gen responsable de este transporte no ha sido identificado todavía, aunque este canal parece explicar los procesos de asimilación de potasio de muy baja afinidad en dichos mutantes. Su actividad está bloqueada por una concentración milimolar de calcio y otros iones metálicos divalentes. Se desbloquea al disminuir la cantidad extracelular de metales divalentes libres por debajo de 10 μM y es independiente de otros transportadores de potasio como Tok1, Trk1 y Trk2. Éste podría rectificar la inhibición del crecimiento de la levadura producida por la interrupción de sus transportadores de potasio. Más tarde, fue propuesto como la ruta principal de captación de iones potasio de baja afinidad en levadura. Los factores que suprimen el canal NSC1 son la alta concentración de calcio, bajo pH extracelular, higromicina B y, en menor medida, tetraetilamonio (Bertl *et al.*, 2002). Aunque no es descartable que este supuesto canal sea el resultado de la contribución de diferentes canales de forma inespecífica.

Salida de potasio.

La existencia del flujo de salida de potasio en *S. cerevisiae* se conoce desde hace mucho tiempo. Existen al menos tres transportadores diferentes en condiciones fisiológicas. Dos de ellos fueron inicialmente identificados como sistemas de salida de sodio, pero también son capaces de mediar el transporte de potasio (Ena1 y Nha1). El tercero, es el único sistema específico de salida de potasio en *S. cerevisiae*: Tok1 (Fig. 1).

Tok1 es el único canal presente en la membrana plasmática de células de levadura que transporta al exterior los iones de potasio (Ariño *et al.*, 2010). Se activa por la despolarización de la membrana plasmática y el K^+ acumulado en las células es probablemente liberado con el fin de regenerar el potencial de membrana.

La captación de sodio.

En el genoma de levadura no aparece ningún transportador específico de sodio. El catión entra de forma significativa en la célula sólo si hay una elevada concentración externa. El sodio inhibe competitivamente la captación de potasio en las células silvestres y por tanto Trk1 podría aceptar y transportar tanto Na^+ como K^+ , aunque con una afinidad mucho más baja. Sin embargo, la inhibición por Na^+ podría ser indirecta, consecuencia de la despolarización de la membrana y el Na^+ podría entrar por el NSC1.

Salida de sodio.

Para mantener una baja concentración de cationes de sodio citosólica tóxica, las células de *S. cerevisiae* utilizan dos tipos de sistemas de salida en su membrana plasmática. A pesar de que estos sistemas se complementan entre sí en función de la desintoxicación, difieren en el mecanismo de transporte y regulación de ambos (Fig. 1).

Ena ATPasas (Efflux of sodium). Son ATPasas tipo P acopladas a la hidrólisis de ATP para el transporte de cationes en contra de gradiente electroquímico, son capaces de extruir Na^+ , Li^+ o K^+ . En *S. cerevisiae* hay una repetición en tándem de genes ENA, pero el primer gen (*ENA1*), es el más importante para la tolerancia de sodio (Rudolph *et al.*, 1995).

Antiportador Nha1. El antiportador Nha1 es el responsable del crecimiento de células con altas concentraciones de KCl y NaCl en valores de pH ácido externo. Además tiene un papel fundamental en la expulsión de iones sodio y potasio gracias al potencial creado por la entrada de protones. Tiene otras funciones como el mantenimiento del pH intracelular, la regulación del ciclo celular, el volumen celular, o el potencial de membrana (Proft and Struhl, 2004).

Es probable que en todas estas funciones fisiológicas, el antiportador Nha1 esté vinculado a la actividad de Trk1 y Trk2, como se ha demostrado que la supresión de Nha1 afecta a la cinética de la captación de potasio de alta afinidad a través de sistemas Trk y, viceversa, que la supresión de Trk1 y Trk2 da como resultado un flujo de salida de potasio disminuido.

Transporte intracelular de cationes.

La concentración de cationes de metales alcalinos dentro de las células de levadura no es homogénea. Hay una diferencia en la concentración de sodio y/o cantidades de potasio en el citosol y en orgánulos individuales. La necesidad fisiológica del transporte de cationes de metales alcalinos a través de las membranas de los orgánulos está conectada al mantenimiento de la homeostasis de potasio y la desintoxicación de sodio en el citosol, así como a la regulación del pH y el volumen. Existen diversos mecanismos de intercambio de protones descritos en cuatro orgánulos. El producto del gen *MDM38* (conservado en eucariotas) se localiza en la membrana mitocondrial interna y es indispensable para el intercambio K^+/H^+ . En la vacuola encontramos al antiportador Vnx1, en el endosoma a Nhx1 y en el aparato de Golgi a Kha1.

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

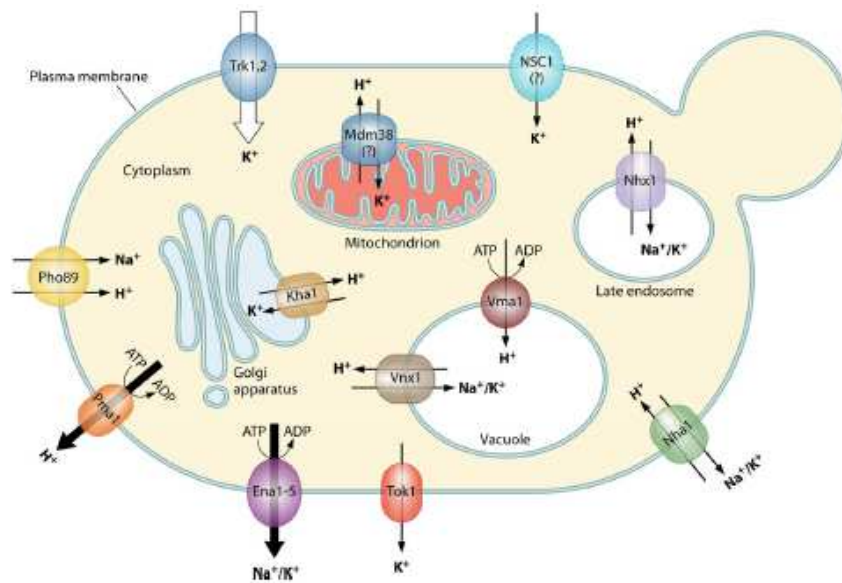


Figura 1. La membrana plasmática y el transporte intracelular de cationes en *S. cerevisiae* (Ariño *et al.*, 2010).

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

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

^a YETI, Yeast Transporter Information (55, 56), based on Transport Classification (TC) system (248).

^b PM, plasma membrane; GA, Golgi apparatus; LE, late endosomes; VAC, vacuole.

^c Bold, preferred substrate; italic, substrate predicted from phenotypic observations.

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

1.3 H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Pma1). Función y regulación.

En plantas, hongos y otros organismos la H⁺-ATPasa (tipo P) es la principal responsable del gradiente electroquímico y por ende, de la homeostasis del pH y de cationes. El medio intracelular en estos organismos se caracteriza por altas concentraciones de iones potasio y magnesio y bajas concentraciones de iones sodio, cloro, hidrógeno y calcio. El medio externo, por el contrario, posee altas concentraciones de Na⁺, Cl⁻, H⁺ y Ca²⁺ y bajas concentraciones de K⁺ y Mg²⁺ (Serrano and Villalba, 1993).

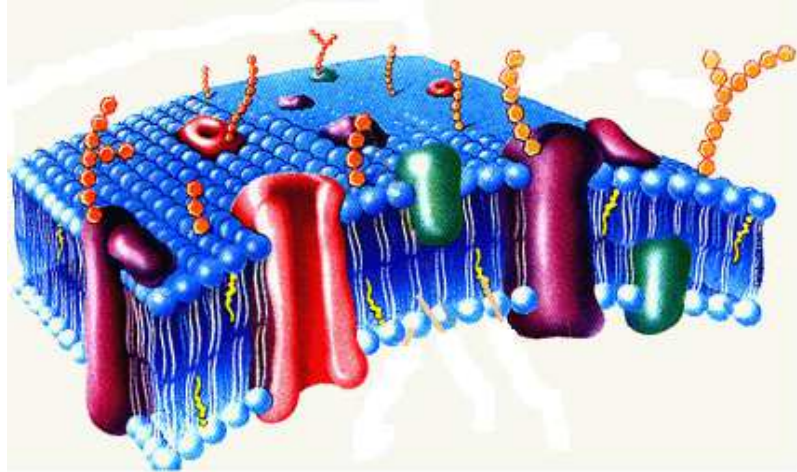


Figura 2. Esquema general de la membrana plasmática de una célula eucariota. Está formada principalmente por una doble capa lipídica, proteínas transmembrana que actúan como canales para el transporte para la célula, proteínas globulares, glicolípidos y glicoproteínas (Serrano and Villalba, 1993).

Evolutivamente la H⁺-ATPasa podría haber surgido debido a la presión selectiva creada por la necesidad de controlar el pH intracelular, ya que la generación de ácidos por el metabolismo anaerobio de las células primitivas tendería a acidificar el medio interno celular. Por tanto, el desarrollo de una enzima capaz de expulsar protones supondría una ventaja evolutiva. Y eso ocurrió con la H⁺-ATPasa, anclada en la membrana y capaz de expulsar protones a costa de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Esta bomba primitiva sería el origen de todas las demás ATPasas posteriores, capaces de transportar otros iones monovalentes o divalentes de sodio, potasio y calcio (Sussman *et al.*, 1989).

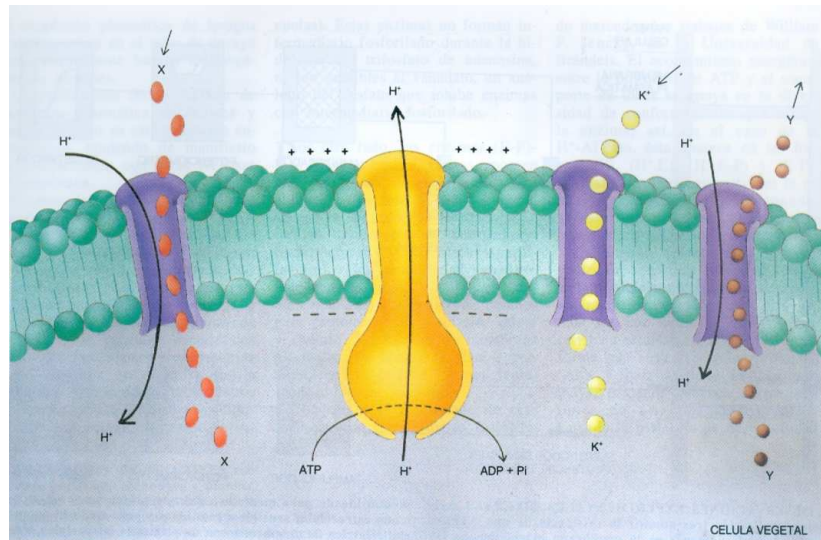


Figura 3. Los circuitos quimiosmóticos de las células eucariotas divergen según hablemos de células vegetales o animales. Los transportes activos secundarios se encuentran acoplados a la entrada de protones (Serrano and Villalba, 1993).

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

Aquí los transportes activos secundarios se encuentran acoplados a la entrada de protones, ya que durante este transporte se produce la entrada de potasio, azúcares, aminoácidos, etc. y la salida de calcio, succinato y lactato entre otras, a través de estos canales proteicos.

Modelo estructural de la H^+ -ATPasa.

La cadena lineal de la H^+ -ATPasa está compuesta por 920-950 aminoácidos. Se pliega en la membrana celular y configura una estructura muy compleja. En el modelo de la figura 4 se destacan los dominios funcionales (fosfatasa, quinasa, inhibidor y transmembrana) y los aminoácidos conservados (I a VI).

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

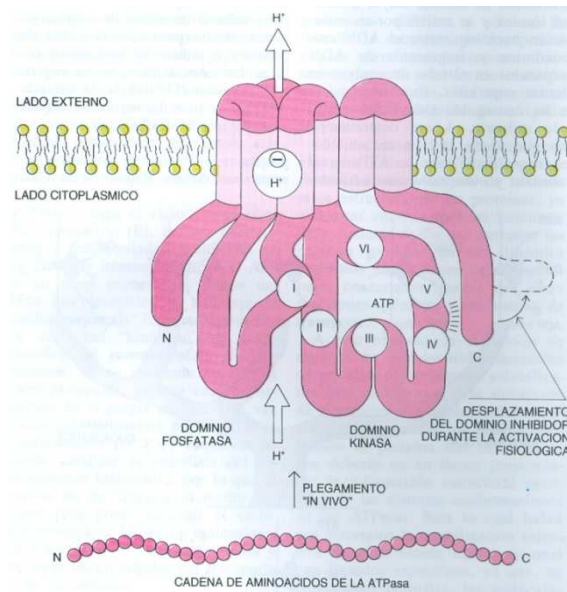


Figura 4. Modelo estructural de la ATPasa de protones (Serrano and Villalba, 1993).

Papel de la H^+ -ATPasa en la homeostasis de cationes de metales alcalinos.

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

La actividad ATPasa es responsable, no sólo del mantenimiento del gradiente electroquímico, sino que se ha demostrado que se correlaciona con el pH intracelular, el transporte de aminoácidos y, lo que es más relevante para los objetivos del presente proyecto, con el crecimiento celular (Serrano and Villalba, 1993). A nivel molecular no tenemos ninguna pista de como la actividad de la H^+ -ATPasa es capaz de regular el crecimiento celular. Toda la información disponible sobre regulación del crecimiento en función de la disponibilidad de nutrientes o del estado energético de la célula se relaciona con la ruta de señalización dependiente de la proteína TOR. Además, Pma1 controla el crecimiento a través del pH intracelular (Serrano and Villalba, 1993).

1.4 Ruta TOR

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

La rapamicina o Sirolimo es un antimicótico obtenido a partir de unas muestras de *Streptomyces hygroscopicus*. Se aisló en la isla de Pascua en 1970 y originalmente se utilizó como un agente antifúngico efectivo contra *Candida albicans*. En la década de los 90 también se descubrió su propiedad como inmunosupresor efectivo en la terapia post trasplante (Vézina *et al.*, 1975). Tiempo después, el medicamento mostró eficacia para combatir algunos cánceres, al frenar la proliferación celular y el crecimiento de los tumores.

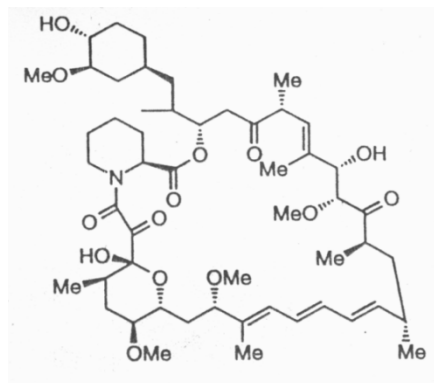
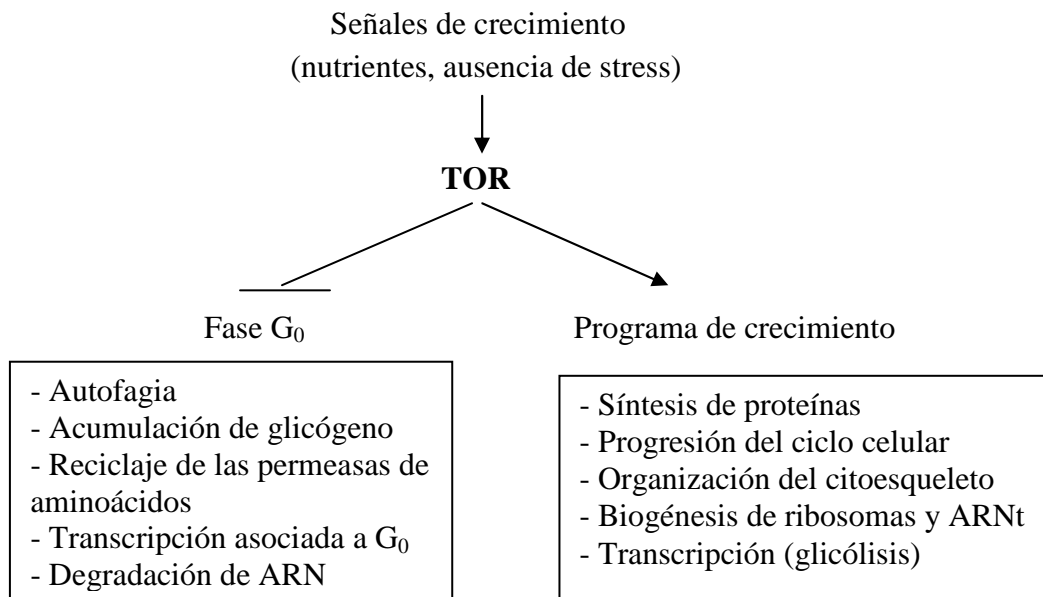


Figura 5. Molécula de rapamicina.

TOR es un miembro de la familia PIKK, una familia de serina/treonina proteína quinasas con homología con fosfatidil inositol quinasa. Está formada por dos complejos llamados TORC1 y TORC2. Estos son reguladores esenciales del crecimiento celular en respuesta a nutrientes, hormonas y estrés (Wullschleger *et al.*, 2006).

TORC1 media el control temporal del crecimiento celular por activación de procesos anabólicos como la biogénesis de ribosomas, síntesis proteica, transcripción, y la absorción de nutrientes; y bloquea procesos catabólicos inhibitorios como la autofagia y la proteólisis dependiente de ubiquitinación.

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

TOR es fundamental en la regulación del crecimiento celular**Complejos TOR: composición, estructura y localización.**

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

<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Mammals
<i>TORC1</i>			
TOR1/TOR2	let-363	TOR-PA	mTOR
KOG1	daf-15	Raptor-PA	Raptor
LST8	C10H11.8	CG3004-PA	mLST8
TCO89	-	-	-
<i>TORC2</i>			
TOR2	let-363	TOR-PA	mTOR
AVO1	-	-	-
AVO2	-	-	-
BIT61	-	-	-
LST8	C10H11.8	CG3004-PA	mLST8
SLM1	-	-	-
SLM2	-	-	-
AVO3/TSC11	F29C12.2	Rictor-PA	Rictor

Tabla 2. Listado de los componentes proteicos que forman los complejos TORC1 y 2 en diferentes especies (Stanfel *et al.*, 2009).

En *S. cerevisiae*, TORC1 está formado por Tor (Tor1 o Tor2), Kog1, Lst8 y Tco89 mientras que TORC2 lo componen Tor2, Avo1, Avo2, Bit61, Lst8, Slm1, Slm2 y Avo3. Además de los componentes principales, ambos complejos pueden contener subunidades específicas de cada especie (Soulard *et al.*, 2009).

TORC1 fue caracterizado por ser inhibido por rapamicina, mientras que TORC2 es insensible. Esto es debido a la capacidad del complejo rapamicina con la proteína Fkbp a unirse directamente a TORC1 pero no a TORC2 (Fig. 6) (Loewith *et al.*, 2002).

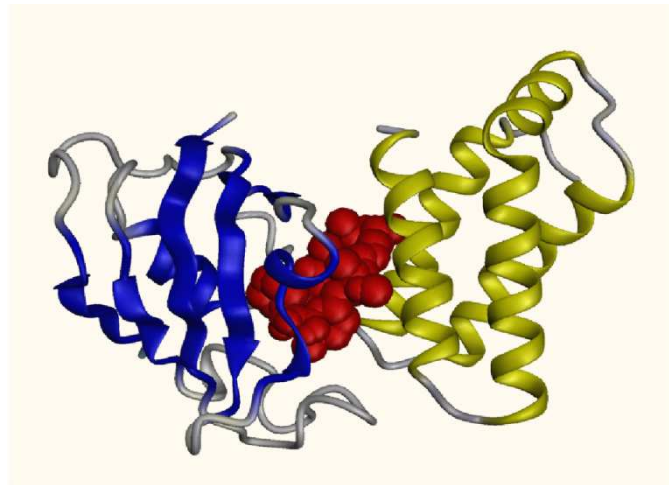


Figura 6. Fkbp-rapamicina-TOR (Dominio de unión a rapamicina).

Localización de los complejos TORC1 y TORC2.

La localización intracelular de TOR y sus complejos ha sido debatida muchos años. En *S. cerevisiae* se ha sugerido que TORC1 se encuentra en la periferia de la membrana plasmática, en los endosomas, en la membrana vacuolar o en el núcleo. Los dos complejos fueron encontrados en un fraccionamiento de las membranas de los endosomas. Además, gracias a versiones de TOR que expresan la proteína GFP en la zona central de la proteína, se ha mostrado que TORC1 está en la membrana de la vacuola mientras que TORC2 se ha localizado en el citoplasma y en algunos lugares de la membrana plasmática (Sturgill *et al.*, 2008).

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

Complejo TORC1

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

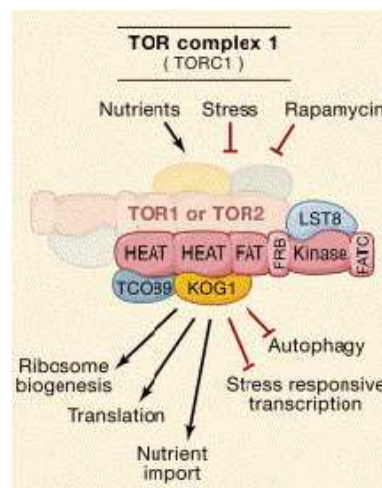


Figura 7. Estructura del complejo TORC1.

Complejo TORC2.

La proteína Tor también participa en el complejo TORC2. A diferencia de TORC1, sólo contiene Tor2 y también Avo1, Avo2, Avo3, Lst8 y Bit61 (Loewith *et al.*, 2002, Reinke *et al.*, 2004). La subunidad catalítica de calcineurina Cna1 puede formar parte de TORC2 en condiciones de ausencia de estrés (Mulet *et al.*, 2006). Avo1, Avo3 y Lst8 son proteínas conservadas y esenciales, necesarias para la actividad quinasa. Por el contrario Avo2 y Bit61 no son esenciales y no hay homólogos identificados en otros eucariotas, aunque la proteína Prr5 de mamíferos guarda cierta similitud con Bit61 y forma parte del complejo mTORC2 (Hayashi *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007). Estudios de la organización molecular del complejo revelaron que el complejo TORC2 se encuentra en levadura en forma de dímero (Wullschleger *et al.*, 2005).

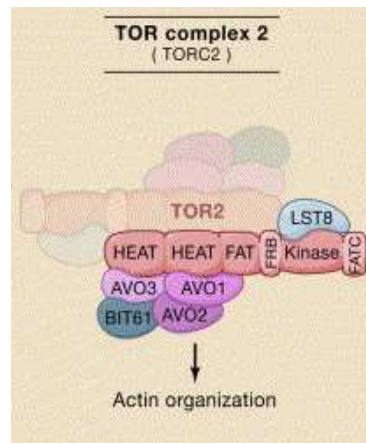


Figura 8. Estructura del complejo TORC2.

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

En 2005 se identificó el primer sustrato para TORC2 de levadura, la proteína quinasa 2 (Ypk2) (Kamada *et al.*, 2005). Ésta es una AGC quinasa estrechamente relacionada con proteínas quinasas de mamífero activadas por factores de crecimiento del suero. TORC2 activa Ypk2 directamente por la fosforilación de Ser641 y Thr659. La actividad de TORC2 también es necesaria para la fosforilación de Pkc1, aunque no está claro si lo fosforila directamente. Recientemente se ha visto que proteínas Slm, las cuales se unen a fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂), han sido caracterizadas como sustratos directos de TORC2. Slm1 y Slm2 pueden regular la organización de la actina independientemente de Ypk2. Sin embargo, un mutante constitutivamente activo de Ypk2 suprime la letalidad provocada por la pérdida completa de TORC2 (Kamada *et al.*, 2005), lo que sugiere que Ypk2 es el principal efector de TORC2.

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

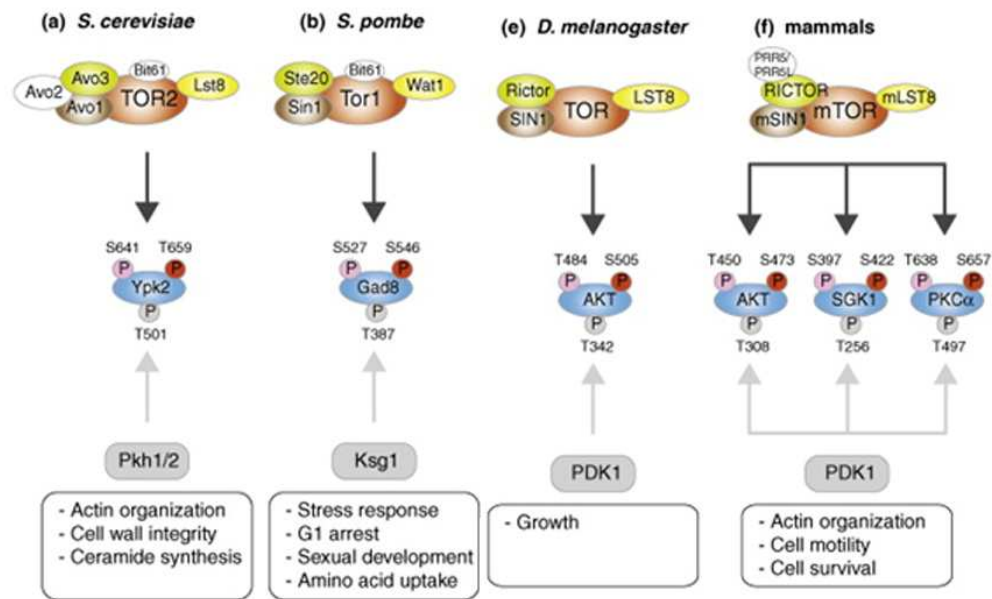


Figura 9. Conservación del complejo TORC2 en diferentes organismos.

En todos ellos TORC2 está compuesto por la quinasa TOR, Lst8, Avo3 o su homólogo y Avo1 o su homólogo. En *S. cerevisiae*, *S. pombe* y en mamíferos se han identificado componentes adicionales. Todos los sustratos de TORC2 son miembros de la familia de AGC quinasas. Las AGC quinasas presentan un modo conservado de regulación de la fosforilación de sus motivos hidrofóbicos, “turn motif” y el bucle de activación. TORC2 fosforila los motivos hidrofóbicos de todas las quinasas. Se ha visto que fosforila los “turn motif” de forma directa o indirecta en Ypk2, Gad8, y AKT de mamíferos y Pkc α . Pdk1, que también se conserva en todos los organismos (Cybulski and Hall, 2009).

En este trabajo nos proponemos estudiar a nivel molecular la relación de la ruta TOR con la H⁺-ATPasa. También caracterizar un poco más cada complejo de TOR y determinar su relación con otras funciones celulares como el transporte de iones y la regulación del citoesqueleto.

OBJETIVOS

En el presente trabajo vamos a estudiar a nivel molecular la regulación de la H⁺-ATPasa por parte de la ruta TOR, fijándonos en los siguientes puntos:

1. Estudio de la actividad de la proteína Pma1 dependiente de TOR.
2. Efecto de la regulación de la H⁺-ATPasa por parte de TORC1 y sus componentes.
3. Relación de TORC2 con el transporte de potasio y la regulación del citoesqueleto.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de levadura.

	Cepa	Genotipo
JM345	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa [His3MX6]-GAL1p::TOR2</i>
JM346	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa [His3MX6]-GAL1p::AVO1</i>
JM347	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa [His3MX6]-GAL1p::AVO3</i>
JM382	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa trk1::TRP1 trk2::kanMX6</i>
JM384	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa [His3MX6]-GAL1p::TOR2 trk1::TRP1 trk2::kanMX6</i>
JM386	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa [His3MX6]-GAL1p::AVO3 trk1::TRP1 trk2::kanMX6</i>
JM392	Sc TB50a	<i>leu2-3, 112, ura 3-52, rme1, trp1, GAL+, HMLa [His3MX6]-GAL1p::AVO1 trk1::TRP1 trk2::kanMX6</i>
RS303	Sc BWG1-7A	<i>(a ade1-100 ura3-52 leu2-3 his4-519 Gal+) + PSB32-PMA1</i> (Portillo and Serrano, 1988)
RS503	Sc BWG1-7A	<i>(a ade1-100 ura3-52 leu2-3 his4-519 Gal+) + PSB32-PMA1^D</i> (Portillo and Serrano, 1988)
Y00000	Sc BY4741	<i>a his3-Δ1 leu2- Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
Y02072	Sc BY4741	<i>a his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 tco89::KANMX</i> (Euroscarf)
	W303-1A	<i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2.3,112 trp1-1 ura3-1</i> (Wallis <i>et al.</i> , 1989)
LY 190	W303-1A	<i>mpk1::LEU2</i> (Merchan <i>et al.</i> , 2004)
LY139	W303-1A	<i>ppz1::URA3 ppz2::TRP1</i> (Merchan <i>et al.</i> , 2004)
LY196	W303-1A	<i>ppz1::URA3 ppz2::TRP1 mpk1::LEU2</i> (Merchan <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 3. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo (sino se indica referencia, están construidas en este trabajo).

3.2 Medios utilizados.

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

Medio completo (YPD): Se compone de extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v). Las placas de medio sólido contienen además 1.5% (p/v) de agar bacteriológico. El 2% de glucosa se sustituye por galactosa al 2% (p/v) en el medio YPGAL, 2% de etanol en el medio YPEtOH o 2% de glicerol en YPGly.

Medio mínimo SD: Se compone de 2% de glucosa, 0.7% de Yeast Nitrogen Base (YNB), 50 mM de ácido succínico a pH 3.5-5.5. A este medio le suplementamos los aminoácidos necesarios según los requerimientos nutricionales. A este medio había que añadirle, según los requerimientos de cada cepa, los aminoácidos y las purinas o pirimidinas correspondientes: adenina (30 µg/ml), histidina (30 µg/ml), uracilo (30 µg/ml), leucina (100 µg/ml), y triptófano (30 µg/ml) seleccionando así las que son auxotróficas para alguno de estos compuestos. El medio SGal se prepara de forma similar, pero sustituyendo el 2% de glucosa por 2% de galactosa.

3.3 Ensayos de crecimiento de colonias de levadura en medio sólido (goteos).

Partimos de cultivos saturados de levadura que se crecían en medios SD a los que se añadían los aditivos que eran necesarios para su crecimiento. A partir de aquí se hacían diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000) en agua estéril. Sobre los medios de cultivo sólidos se depositaban unas gotas de unos 3-5 µl de cada dilución con un replicador de acero con el que además podíamos realizar tres repeticiones de cada una de las diluciones. Las placas se incubaron a 28° C, salvo que se indique lo contrario. Al cabo de 4-7 días se observaban las diferencias en el tamaño de colonia.

3.4 Determinación de la actividad enzimática de la H⁺-ATPasa.

El protocolo está basado en el micrométodo del molibdato-ácido sulfúrico-ascorbato que se basa en medir el fosfato liberado por consumo de ATP de un extracto de membranas (Serrano, 1988). En primer lugar las células lavadas en agua y concentradas se trataban brevemente (5 min) con glucosa para recuperar el estado fisiológico activado de la ATPasa. Se rompían por agitación con bolas de vidrio y se obtenía una fracción mitocondrial. En breve: La actividad específica de la Pma1 ATPasa en las membranas crudas es del orden de 0.1 mU/µg. Para determinarla utilizaremos extractos crudos de proteína de membrana crudas (3 ó 6 µg). Añadimos 65 µl de tampón de reacción (50mM MES-Tris pH5.7, 5 mM KNO₃, 5 mM ázida de sodio, 0.3 mM molibdato sódico y 2mM ATP) precalentado a 30°C e incubamos 20 minutos a esa temperatura. Paramos la reacción con 130 µl del reactivo fosfato con ascórbico (2% ácido sulfúrico, 0.5% molibdato amónico, 0.5% SDS y 1/100 de volumen de ascórbico al 10%. Ascórbico 10%: 100 mg/ml agua), dejamos desarrollar color durante 5 minutos y leemos la absorbancia con un lector de microplacas con filtro de 690 nm.

Pocillos con 0, 2 y 4 μ l de patrón de fosfato 5mM. Añadimos tampón de reacción como a las muestras e incubamos y procesamos igual. Los pocillos sin fosfato servirán para ajustar a cero el espectrofotómetro. Aunque el ATP lleva una pequeña cantidad de fosfato (del orden del 1%), la absorbancia correspondiente será ajustada a cero y descontada del fosfato generado por hidrólisis espontánea del ATP. El cálculo final se hace referido a una curva patrón realizada con fosfato.

3.5 Determinación del contenido interno de potasio.

Las células fueron crecidas en YPD hasta una absorbancia a 660 nm de 0.6 – 0.7. Alícuotas de 50 ml fueron centrifugadas 5 minutos a 3000 rpm, y lavadas dos veces con 50 ml de solución de lavado frío (20 mM $MgCl_2$). El pellet de células fue resuspendido con 5 ml de esta solución de lavado. Los iones fueron extraídos hirviendo las células 15 minutos a 95°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue analizado con un espectrofotómetro de absorción atómica (Mulet *et al.*, 1999).

3.6 Tinción del citoesqueleto.

Células crecidas en YPD durante 15 horas ($OD \approx 0.6-0.7$) fueron fijadas en formaldehído (3.7%) y en tampón de fosfato de potasio (100mM [pH 6.5]) y teñidas con tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC) – phalloidin (Sigma) para visualizar la actina, como se describe previamente (Benedetti *et al.*, 1994) durante 12 horas, pasadas las cuales se lavaron y se resuspendieron en tampón fosfato.

RESULTADOS

4.1 TOR regula Pma1 a nivel de actividad de la proteína.

No hay ninguna descripción en la literatura que relacione a nivel genético o bioquímico la actividad de la protein quinasa TOR con la H^+ -ATPasa Pma1. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que TORC1 regula la H^+ -ATPasa a diferentes niveles. La inhibición de TORC1 con rapamicina o utilizando un alelo termosensible implica una caída de la expresión del gen. No obstante ese cambio de expresión no se ve reflejado en una disminución de la cantidad de proteína. La disminución de Pma1 no se aprecia hasta tiempos más largos. Experimentos con cicloheximida demostraron que la gran estabilidad de Pma1 explica esta aparente discrepancia. La inhibición de TORC2 no tiene efecto en la expresión de Pma1 o en la estabilidad de la proteína (Cabedo, 2011). Para proseguir con el estudio de esta relación a nivel molecular, analizamos la actividad de la H^+ -ATPasa, medida en forma de consumo de ATP de membranas enteras.

La H^+ -ATPasa tiene residuos fosforilados (Portillo and Serrano, 1988), por lo que no podemos descartar que el efecto de la ruta TOR sobre la H^+ -ATPasa se realice a nivel de actividad de la proteína, posiblemente por fosforilación directa o por fosforilación/defosforilación mediante alguna proteína quinasa o proteína fosfatasa regulada por TOR como Npr1, Ypk, o Sit4.

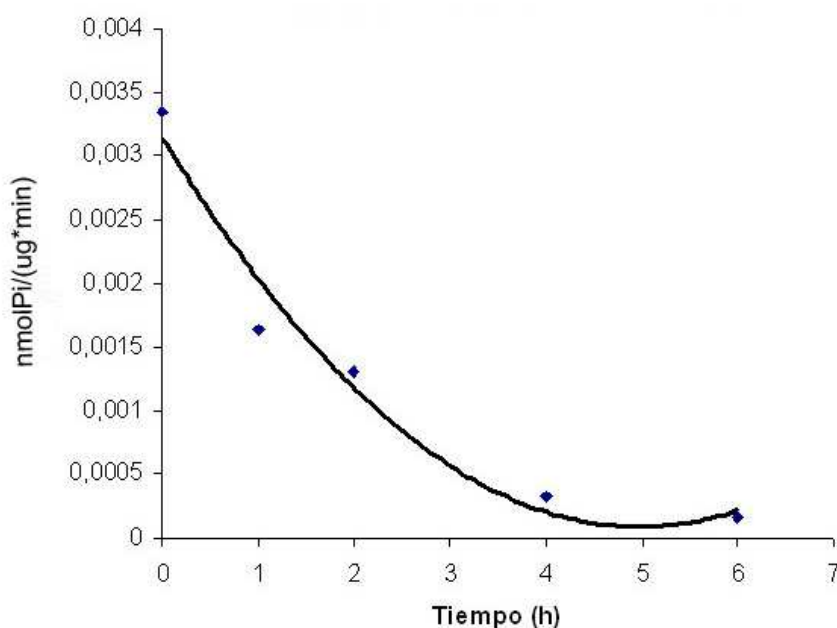
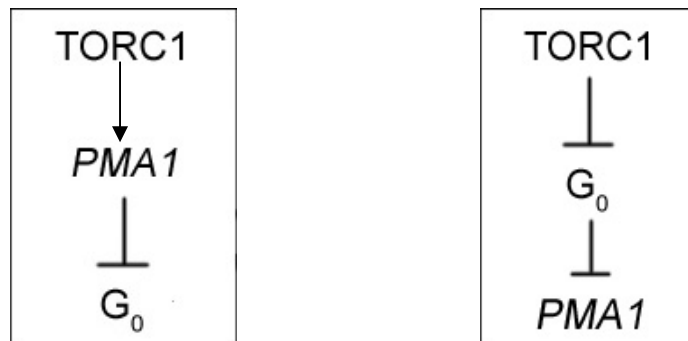


Figura 10. La rapamicina inhibe la actividad ATPasa. Medida de la actividad (nmolPi/(µg*min)) en una cepa TB50 tratada con rapamicina. La actividad ATPasa se determinó a partir de membranas purificadas, medida en forma de fosfato liberado a partir de ATP.

Una hora después del tratamiento con rapamicina la actividad cae a la mitad mientras que el descenso en la expresión del gen se nota a las 4 o 6 horas, lo que implica que hay una regulación a nivel de actividad de la proteína, mediada posiblemente por fosforilación/defosforilación.

4.2 Efecto de la regulación de la H⁺-ATPasa por parte de TORC1 en la entrada en G₀.

TORC1 integra las señales del estado energético de la célula en presencia de nutrientes y en ausencia de estrés y es capaz de activar el programa de crecimiento. Si alguna de estas señales falla la actividad de TORC1 disminuye y la célula entra en fase G₀, en la cual se para el crecimiento de forma indefinida. En el caso de inhibición parcial de TORC1 se observará una reducción de la velocidad de crecimiento. La rapamicina bloquea TORC1 e induce artificialmente una fase G₀. Hemos demostrado que inhibir la actividad de TORC1 induce una disminución de la actividad de la H⁺-ATPasa. No obstante la pregunta es: ¿La inhibición de Pma1 es necesaria para que la célula entre en G₀ o se reduzca la velocidad de crecimiento? O por el contrario ¿La inhibición de Pma1 es una consecuencia de que la célula entre en G₀ o se reduzca la velocidad de crecimiento?



Para determinar cuál de estas dos hipótesis es correcta hemos comparado la sensibilidad a la rapamicina de una cepa portadora de un alelo silvestre de *PMA1* (RS 303) y una cepa que contiene un alelo truncado en el extremo carboxilo de Pma1 (alelo *pma1-245*). Este dominio es autoinhibidor (Fig 4. Serrano and Villalba, 1993) de forma que la cepa portadora de este alelo (RS503) Pma1 está activada constitutivamente. Si inhibir la actividad de bombeo de protones de Pma1 es necesaria para entrar en G₀ o reducir la velocidad de crecimiento, una versión constitutivamente activa de Pma1 tendrá problemas para frenar su crecimiento y será tolerante a rapamicina, si por el contrario inhibir Pma1 es un efecto más de entrar en G₀ o reducir la velocidad de crecimiento, la versión constitutivamente activa de Pma1 será tan sensible a rapamicina como una cepa silvestre. Una tercera posibilidad es que la actividad normal de Pma1 sea nociva en la fase G₀ o en un crecimiento enlentecido, por lo que sea necesario inhibirla, en este caso la cepa que tiene Pma1 constitutivamente activada será sensible a rapamicina.

En este experimento queremos ver si la rapamicina inhibe a la cepa RS503, es decir, si se inhibe la Pma1 que está activada constitutivamente, para determinar cuál de las hipótesis anteriores es la correcta. Queremos determinar si la inhibición de la proteína ATPasa es una consecuencia directa de inhibir la ruta TOR o por el contrario si es un efecto secundario producido por la parada del crecimiento celular. Así mismo también queremos determinar si el presunto efecto de TORC1 sobre Pma1 se realiza a nivel del extremo carboxi terminal.

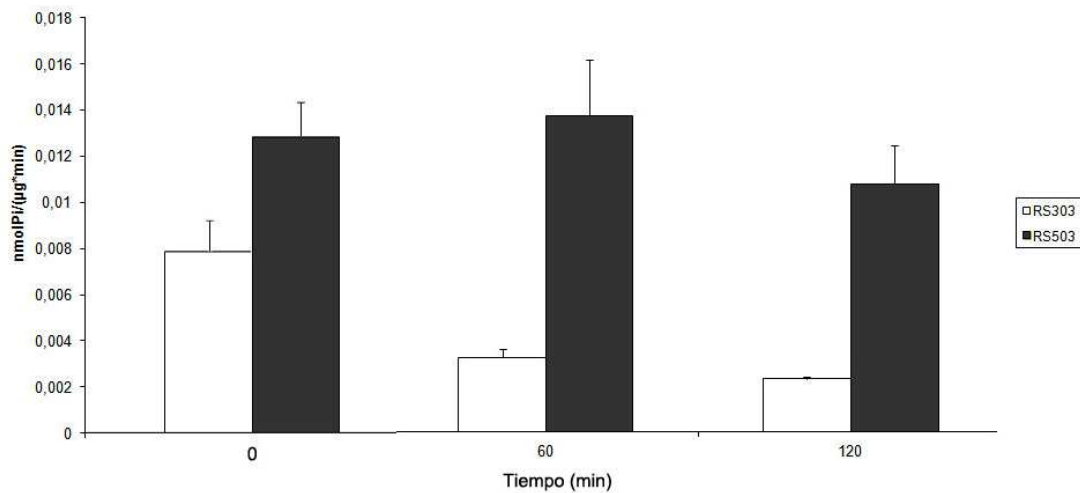


Figura 11. Medida de la actividad en cepas de levadura mutantes tratadas con rapamicina. Variación de los nmoles Pi/(µg·min) a lo largo del tiempo representando la funcionalidad de la proteína H⁺-ATPasa. Cepa RS 303 es un WT, cepa RS 503 (alelo *pma1* – 245) contiene una mutación hiperactiva de la ATPasa, eliminamos el extremo carboxi terminal, que es la única regulación conocida.

En la gráfica se observa que la actividad del alelo mutante *pma1* sigue siendo superior que la del WT, aunque a tiempos largos se observa una caída en la actividad, indicando que posiblemente la regulación se haga a nivel de la proteína fuera del carboxi terminal. No obstante este experimento todavía no nos permite saber cuál de las hipótesis es la correcta. Para poder obtener una conclusión realizamos un segundo experimento de crecimiento en medio rico YPD con diferentes cantidades de rapamicina.

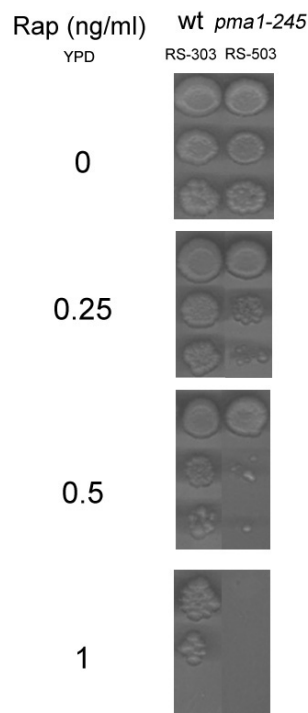


Figura 12. Crecimiento de las cepas de levadura en medio YPD a diferentes concentraciones de rapamicina. RS 303 es un WT, RS 503 contiene una mutación hiperactiva (alelo *pma1* – 245) de la H⁺-ATPasa, eliminamos el extremo carboxi terminal, que es la única regulación conocida.

Se observa una mayor sensibilidad en la cepa con la H⁺-ATPasa hiperactiva (menor crecimiento en rapamicina respecto al control). Por lo tanto la tercera de las hipótesis es la correcta. La inhibición de Pma1 por parte de TORC1 no es necesaria para entrar en G₀, no obstante sí que es necesaria, puesto que en la fase G₀ un exceso de actividad de Pma1 es perjudicial para la célula.

4.3 Tco89 relaciona TORC1 y la regulación del potencial de membrana.

El complejo TORC1 en levadura está compuesto por Tor1 o Tor2, las proteínas esenciales Lst8 y Kog1 (Loewith *et al.*, 2002) y la proteína no esencial Tco89 (Reinke *et al.*, 2004). Originalmente esta proteína no tenía ningún fenotipo característico, salvo que el mutante es sensible a rapamicina, tiene defectos en la pared celular, y que es letal en combinación con mutaciones que provocan una disminución de función de Tor1, lo que indica que tiene una baja actividad de Tor1 y tiene también una segunda peculiaridad, solo participa en el complejo TORC1 cuando aparece Tor1, pero no cuando está formado por Tor2 (Reinke *et al.*, 2004). El grupo de Joaquín Ariño, en Barcelona, realizó un estudio a nivel de toda la colección de mutaciones no letales de levadura buscando fenotipos que pudieran correlacionarse con alteraciones del potencial de membrana. Estas mutaciones suelen hacerse evidentes por un fenotipo de tolerancia o sensibilidad pleiotrópico a diferentes cationes tóxicos (Mulet *et al.*, 1999). Normalmente un fenotipo de tolerancia suele correlacionar con una disminución de potencial de membrana. Esta disminución puede deberse a una disminución de la actividad de Pma1, o a un incremento de la toma de potasio por parte de Trk1,2 que es el principal consumidor de potencial de membrana. A la inversa, un fenotipo de sensibilidad suele correlacionar con un incremento de potencial de membrana debido a la pérdida de función de Trk1,2 o al incremento de actividad de Pma1. Los fenotipos del mutante *tco89* indicaban una hiperpolarización de la membrana. Puesto que habíamos relacionado TORC1 con la regulación a nivel de actividad de Pma1, formulamos la hipótesis de que es un regulador negativo de dicho complejo y por tanto su acción provoca una inhibición de la H⁺-ATPasa.

TCO89 ———| H⁺ATPasa

Para ello medimos la actividad de la H^+ -ATPasa en cepas mutantes de Tco89.

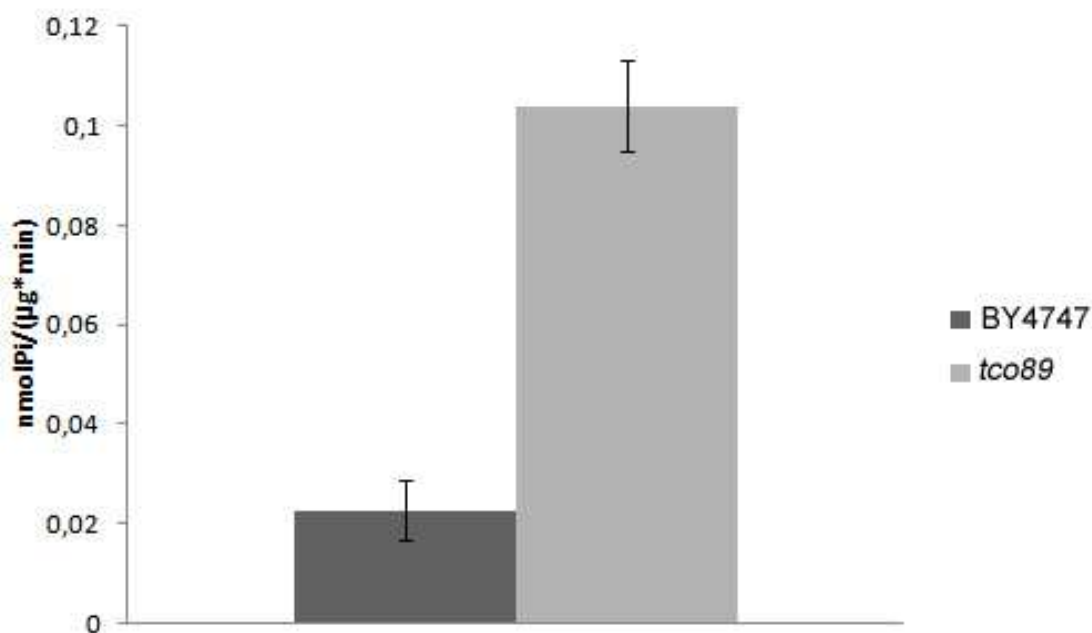


Figura 13. Medida de la actividad de dos cepas de levadura. Variación de los nmoles Pi/(µg·min) en un punto concreto. BY4747 (control), *tco89* (mutante deficiente en Tco89).

Los resultados determinan que al no estar el elemento Tco89 del complejo 1, la H^+ -ATPasa aumenta su actividad y presenta una mayor actividad respecto a la cepa control.

Para confirmar el resultado de la mayor actividad de Pma1 en el mutante *tco89*, realizamos un control adicional. Mantener el potencial de membrana, es, junto a la síntesis de proteínas, las actividades celulares más costosas energéticamente, y por tanto las que más ATP consumen. Según nuestros resultados el mutante *tco89* tiene una actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática 5 veces superior a la cepa silvestre. Esto implica un consumo de ATP mucho mayor que el de una cepa silvestre. La levadura en un medio rico y utilizando glucosa como fuente de carbono (como el medio YPD) tiene un metabolismo anaerobio o fermentativo, en el que consume glucosa y produce etanol. En fuentes de carbono pobres, la síntesis de ATP no es tan eficiente, por lo que la levadura tiene que pasar a un metabolismo aerobio o respiratorio. Hemos comprobado que el mutante *tco89* tiene la actividad de Pma1 hiperactivada. La hipótesis sería que tiene una mayor demanda de ATP que la cepa silvestre, por lo que en una fuente pobre de carbono tendrá problemas de crecimiento, puesto que la síntesis de ATP es menos eficiente. Para confirmar esto, comparamos el crecimiento de una cepa silvestre y de un mutante en fuentes pobres de carbono como etanol, galactosa o glicerol.

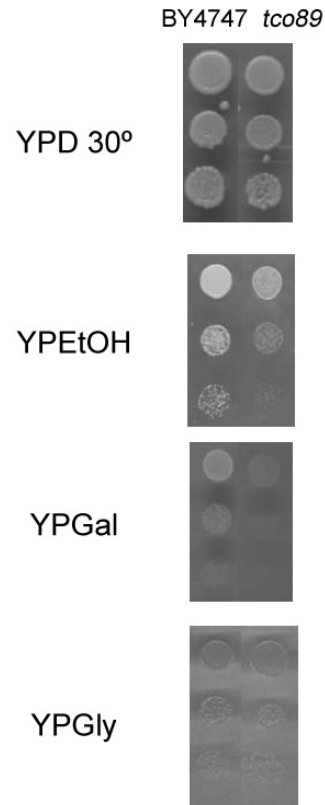


Figura 14. Crecimiento de las cepas de levadura en diferentes medios de cultivo pobres en carbono. BY4747 (control), *tco89* (mutante deficiente en Tco89).

Podemos ver como la cepa control tiene un crecimiento limitado en medios no fermentativos. El mutante *tco89* presenta un crecimiento menor que el control y esto podría deberse a que tiene la H^+ -ATPasa más activa. Ésta requiere más ATP y como es limitante en estos medios, la levadura crece menos. Por lo tanto Tco89 podría estar relacionando el complejo TORC1 con la regulación de la H^+ -ATPasa, aunque no se pueden descartar otras hipótesis.

4.4 Relación entre TORC2 y el transporte de potasio de alta afinidad.

Como se ha mencionado anteriormente la regulación del potencial de membrana depende del equilibrio entre la actividad de bombeo de protones de Pma1 y de la toma de potasio por parte de Trk1,2. Así mismo la señalización dependiente de TOR se divide entre la señalización sensible a rapamicina o dependiente de TORC1, o señalización insensible a rapamicina, o dependiente de TORC2. Tradicionalmente la regulación dependiente de TORC2 ha sido la polarización del citoesqueleto de actina en función del ciclo celular (Helliwell *et al.*, 1998). Recientemente la señalización dependiente de TORC2 ha ido ganando relevancia y se ha relacionado con la regulación negativa de la respuesta a estrés (Mulet *et al.*, 2006) y con la síntesis de proteínas (Oh *et al.*, 2010), por lo que los límites entre la señalización dependiente de TORC2 y de TORC1 están cada vez más difusos.

La actividad de TORC2 es esencial. Un mutante *tor2* en levadura es letal, a diferencia de un mutante *tor1* que es viable puesto que Tor2 puede formar parte de TORC1. No obstante la sobreexpresión de proteínas pertenecientes a la ruta de señalización de PKC, encargada del mantenimiento de la pared celular, o de la ruta de señalización de lípidos dependiente de MSS4, suprime esta letalidad (Helliwell *et al.*, 1998). De la misma manera un mutante letal condicional de Tor2 crecido en medio con sorbitol o sodio, deja de ser letal. Estos fenotipos, conocidos desde la identificación de Tor2 no tienen una explicación a nivel molecular. En trabajos anteriores (Cabedo, 2011), hemos demostrado que TORC2 no regula a la H⁺-ATPasa, no obstante algunas publicaciones apuntaban a una posible interacción entre TORC2 y la regulación de la toma de potasio por alta afinidad. La proteína fosfatasa Ppz1,2 es un regulador negativo de Trk1,2 (Yenush *et al.*, 2002). Un mutante *ppz1,2* tiene Trk1,2 constitutivamente activado, por lo que presenta un fenotipo pleiotrópico de tolerancia a cationes tóxicos y tiene despolarizado el potencial de membrana. Esta hiperactividad de Trk1,2 provoca un aumento del volumen celular y aumenta la tensión de la pared celular. Un doble mutante *ppz1,2* unido a una mutación que haga más débil la pared celular (mutantes de la ruta PKC) no es viable, ya que la pared celular no es capaz de soportar el aumento de la presión de turgencia y la célula sufre una lisis celular. Añadir sorbitol al medio suprime esta letalidad puesto que tiene un papel osmoprotector (Merchán *et al.*, 2004).

Tomados en conjunto se hace evidente una similitud de fenotipos entre los mutantes esenciales de TORC2 y el doble mutante *ppz1,2*. Una forma de explicar que el sorbitol y la sobreexpresión de la señalización dependiente de PKC supriman la letalidad de un mutante letal condicional de *tor2*, sería que este mutante tuviera la actividad de Trk1,2 constitutivamente activada de forma que reforzar la pared celular suprime la letalidad del mutante debido a que puede hacer frente a este aumento de la presión de turgencia. Si esta hipótesis fuera correcta, un triple mutante *trk1,2 tor2* debería ser viable o por lo menos, ser más resistente en medio restrictivo que el mutante *tor2*. Para confirmar esta hipótesis utilizamos una versión de Tor2 que se expresa bajo el promotor de galactosa, de forma que en medio con galactosa es viable, pero en medio con glucosa se reprime la expresión y es letal. Para confirmar que este fenotipo depende de TORC2, y no

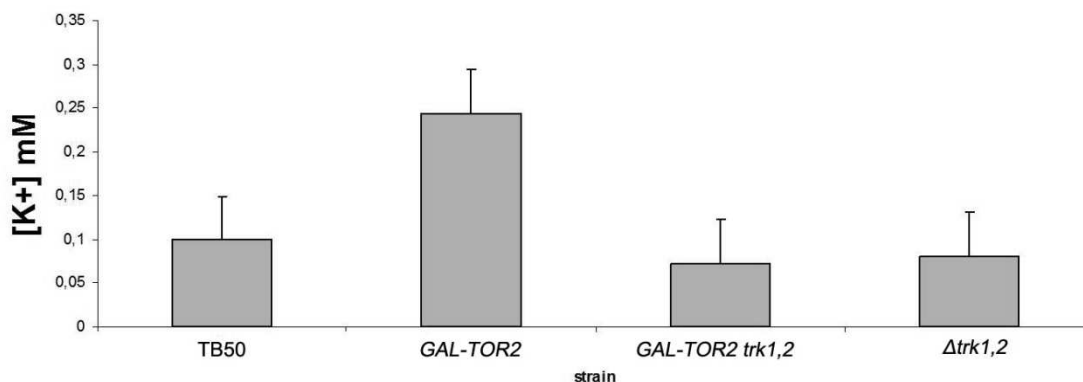


Figura 16. Análisis de la cantidad de potasio intracelular. Determinación de la cantidad de potasio en diferentes cepas mutantes de levadura. TB50 es la cepa silvestre. Las cepas están crecidas en medio YPD para eliminar el complejo 2 de TOR.

Los datos muestran que la cepa *GAL-TOR2* presenta mucha más acumulación de potasio ya que al no estar TORC2 el canal TRK está siempre activado, cuando no está ni el complejo ni dicho canal hay menor cantidad de potasio pero se comporta muy similar al control.

4.5 Tor2 y el citoesqueleto.

Como hemos dicho en la introducción, una de las funciones del complejo 2 de TOR es la regulación de la polarización de la actina del citoesqueleto. Hemos demostrado que el triple mutante *trk1,2 tor2* no es letal. Cuando se suprime la letalidad del mutante *tor2* sobreexpresando los componentes de la ruta PKC el fenotipo de despolarización del citoesqueleto de actina también se corrige. Para confirmar que la mutación de *Trk1,2* corrige el fenotipo de despolarización de la actina teñimos el citoesqueleto utilizando faloidina (un compuesto químico que se une a los microfilamentos de actina) unida a un colorante fluorescente (Alexa).

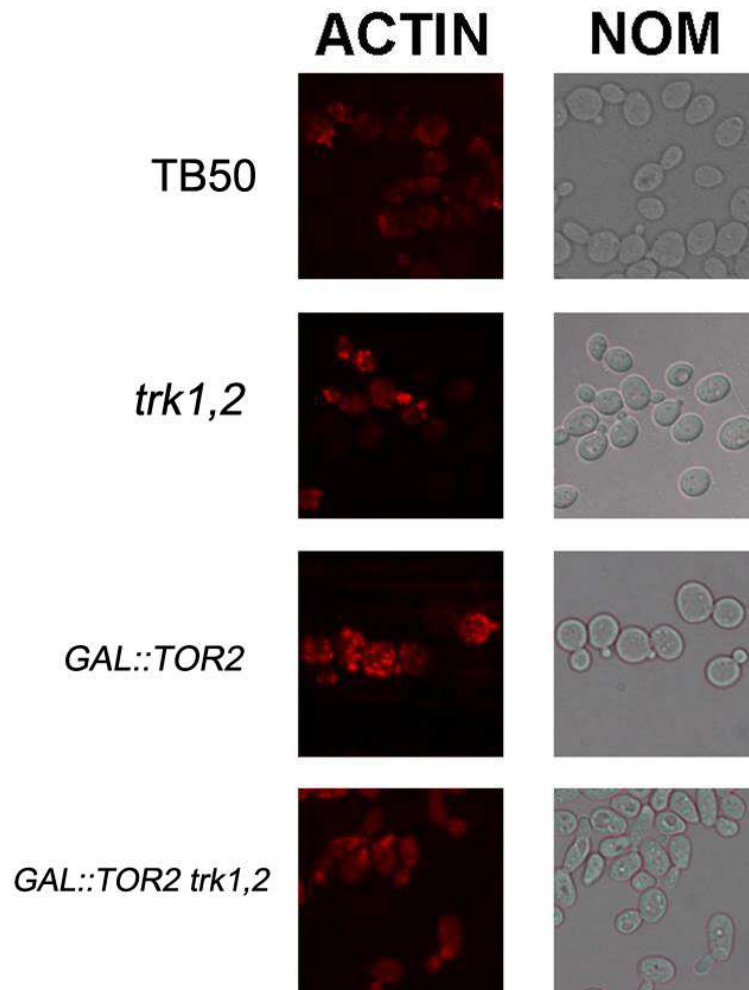


Figura 17. Análisis por microscopía del citoesqueleto. Tinción del citoesqueleto de diferentes mutantes de levadura crecidos en medio con glucosa. TB50 (cepa silvestre). NOM (Nomarsky), ACTIN (fluorescencia).

En una célula silvestre en el momento de la gemación se observa que la mayoría de la actina se concentra hacia el polo de gemación, observándose unos parches distintivos, en cambio en un mutante *tor2*, el fenotipo de despolarización implica que desaparecen estos parches y aparecen distribuidos aleatoriamente por toda la célula. En el triple mutante *trk1,2 tor2* pudimos observar que obteníamos células donde la actina presenta una distribución similar a la cepa silvestre.

Gracias a la información que aparece en la literatura sobre el mutante *ppz1,2* y su relación con la ruta de PKC hemos podido relacionar a TORC2 con Trk1,2 debido a la gran similitud de fenotipos. Hemos demostrado que la mutación de Trk1,2 suprime la letalidad condicional de los componentes esenciales del complejo TORC2 y que el principal problema de estos mutantes es que al tener la toma de potasio por Trk1,2 constitutivamente activada no pueden hacer frente a la elevada presión de turgencia. El fenotipo establecido de la pérdida de función de TORC2 es la despolarización del citoesqueleto de actina, aunque a nivel molecular no se ha encontrado ninguna relación entre TORC2 y el citoesqueleto. Podemos suponer que la despolarización del

citoesqueleto no es una diana de regulación de TORC2, sino una consecuencia de la hiperactivación de Trk1,2. Para confirmar esta hipótesis observamos el citoesqueleto en diferentes mutantes de *mpk1* y *ppz1,2*. Mpk1 es una proteína quinasa implicada en la señalización dependiente de PKC, de forma que el mutante de este gen tiene una pared celular debilitada. El mutante *ppz1,2* tiene sobreactivada la toma de potasio dependiente de Trk1,2. Los dos mutantes son viables independientemente, pero la combinación es letal, puesto que la pared celular debilitada con mayor actividad de toma de potasio produce una lisis celular. Esta cepa es viable si se crece en una concentración de sorbitol de 1M. La hipótesis sería que si crecemos el triple mutante *ppz1,2 mpk1* en sorbitol y lo pasamos a un medio sin sorbitol, en el que no es viable, uno de los efectos de esta falta de viabilidad será la despolarización del citoesqueleto.

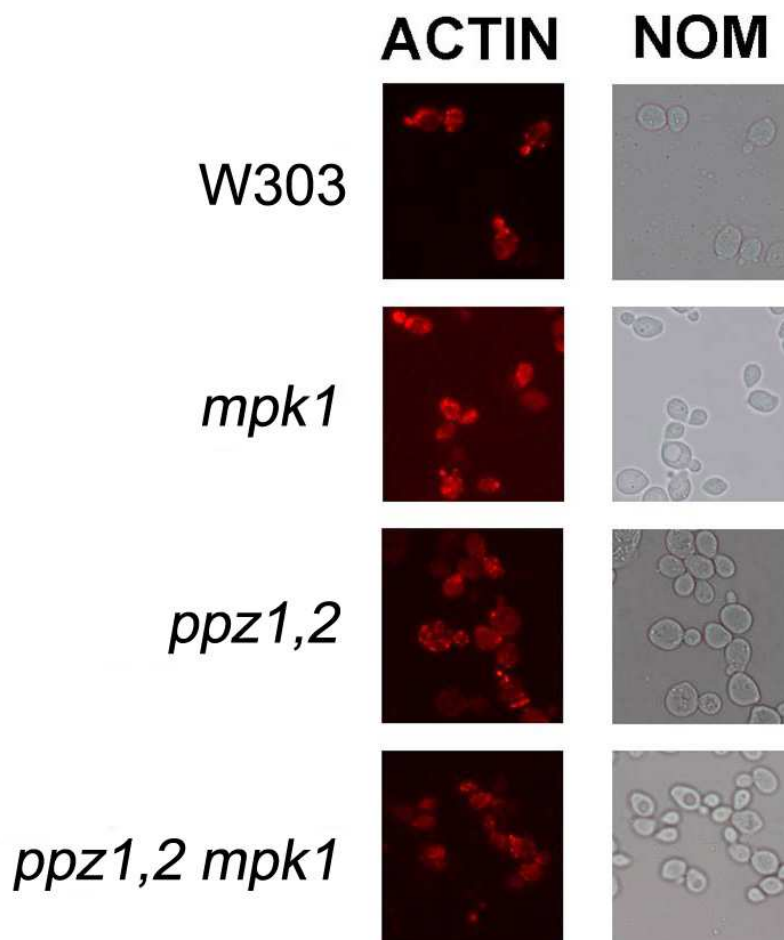


Figura 18. Análisis por microscopía del citoesqueleto. Tinción del citoesqueleto de diferentes mutantes de levadura. W303 (cepa silvestre).

Como aparece en la figura 18, el mutante *ppz1,2 mpk1* tiene despolarizado el citoesqueleto y por lo tanto hemos demostrado que la sobreactivación de Trk1,2 correlaciona con una despolarización del citoesqueleto de actina.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos estudiado la regulación a nivel molecular de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática por parte de la ruta TOR. Esta ruta es la principal responsable del control del crecimiento celular en presencia de nutrientes. La actividad de la H⁺-ATPasa se correlaciona con el crecimiento celular. Dicha proteína es la responsable de la generación del gradiente de pH que genera un potencial de membrana que es utilizado por la célula para transportar moléculas a través de la membrana plasmática. Puesto que la H⁺-ATPasa se activa en presencia de nutrientes y TOR es responsable de la regulación en función del estado nutricional de la célula, tenemos una evidencia indirecta de una relación entre estos dos procesos.

En proyectos anteriores se concluyó que existía una relación entre la H⁺-ATPasa y la ruta TOR (Cabedo, 2011). En el presente trabajo vamos a dilucidar aun más esta relación y a determinar la importancia de los dos complejos TOR.

En la primera parte del proyecto analizamos la actividad de la proteína Pma1 medida en forma de consumo de ATP de membranas enteras. Una hora después de la inhibición del complejo 1 de TOR con rapamicina la actividad de Pma1 cae a la mitad mientras que el descenso en la expresión del gen se nota a las 4 o 6 horas, lo que implica que hay una regulación a nivel de actividad de la proteína, mediada posiblemente por fosforilación/defosforilación.

Hemos demostrado que inhibir la actividad de TORC1 induce una disminución de la actividad de la H⁺-ATPasa. TORC1 integra las señales del estado energético de la célula en presencia de nutrientes y ausencia de estrés y activa el programa de crecimiento. Si alguna de estas señales falla la actividad de TORC1 disminuye y la célula entra en fase G₀, en la cual se para el crecimiento de forma indefinida. No obstante la pregunta es: ¿La inhibición de Pma1 es necesaria para que la célula entre en G₀? O por el contrario ¿La inhibición de Pma1 es una consecuencia de que la célula entre en G₀? También puede ocurrir una tercera posibilidad que es que la actividad normal de Pma1 sea nociva en la fase G₀, por lo que sea necesario inhibirla.

Estas hipótesis se ponen a prueba mediante la medida de la actividad en cepas de levadura mutantes tratadas con rapamicina para inhibir a la ruta TOR. Probablemente la rapamicina inhibe el crecimiento por dos motivos: por inhibir la síntesis de proteínas dependiente de TORC1 y por inhibir a Pma1. Si no puede inhibir Pma1 en el mutante constitutivamente activado se produce una descompensación que inhibe o mata a las células mucho más que cuando actúa la rapamicina. Observamos que la actividad del alelo mutante de Pma1 constitutivamente activo sigue siendo superior que la cepa silvestre, aunque a tiempos largos se observa una caída en dicha actividad, indicando que posiblemente la regulación a largo plazo sea por caída de la expresión. Un segundo experimento de crecimiento en medio rico YPD con diferentes concentraciones de rapamicina nos hace ver que hay una mayor sensibilidad en la cepa con la H⁺-ATPasa constitutivamente activa (menor crecimiento en rapamicina respecto al control). Por lo tanto la tercera de las hipótesis es la correcta. La inhibición de Pma1 por parte de TORC1 no es necesaria para entrar en G₀, no obstante en la fase G₀ un exceso de

actividad de Pma1 es perjudicial para la célula, por eso se produce dicha inhibición. En el experimento de la figura 12, no se produce una entrada en G₀, sino una disminución de la velocidad de crecimiento por inhibición parcial de TOR.

La proteína no esencial Tco89 del complejo 1 de TOR de alguna manera regula la actividad de forma negativa de la H⁺-ATPasa, ya que hemos demostrado que en mutantes deficientes en dicho elemento la actividad de Pma1 es cinco veces superior a la cepa silvestre. Para confirmar dicho resultado, comparamos el crecimiento de una cepa silvestre y de un mutante en fuentes pobres de carbono ya que la cepa mutante necesitará mucho más ATP porque presenta una actividad de Pma1 hiperactivada. Podemos ver como la cepa control tiene un crecimiento limitado en medios no fermentativos. El mutante *tco89* presenta un crecimiento menor que el control y esto podría deberse a que tiene la H⁺-ATPasa más activa. También podría deberse a otros efectos de esta mutación *tco89* al alterarse TORC1. Tampoco puede descartarse que el complejo TORC1 alterado por la falta de la proteína Tco89 no soporte el crecimiento en estos medios no fermentativos. Ésta requiere más ATP y como es limitante en estos medios, la levadura crece menos. Por lo tanto Tco89 estaría relacionando el complejo TORC1 con la regulación de la H⁺-ATPasa.

El complejo 2 de TOR podría estar relacionado con el transporte de potasio de alta afinidad dada la evidencia demostrada en este trabajo de que la mutación de Trk1,2 suprime la letalidad de un mutante letal condicional de *tor2*. No puede descartarse que TORC2 regule la integridad de la pared celular, aunque las medidas de concentración de potasio interno sugieran que la diana de TORC2 es TRK y no la pared. Este mutante podría tener la actividad de Trk1,2 constitutivamente activada de forma que reforzar la pared celular suprime la letalidad del mutante debido a que puede hacer frente a este aumento de la presión de turgencia por no tener regulado el canal de potasio. Por esto estudiamos la hipótesis de que TORC2 inhibe al transportador de potasio Trk1,2 de forma directa o mediante Ppz1,2. El estudio de diferentes cepas mutantes determina que el crecimiento de algunos mutantes es limitante dando a entender que existe una relación entre TORC2 y el canal TRK, ya que cuando no está Tor2 o alguno de sus componentes esenciales la célula muere porque el canal de potasio no está regulado, estando siempre activo. En cambio cuando tampoco está el canal TRK la célula es viable.

Para tener un evidencia directa de esta relación estudiamos el transporte de potasio en cepas mutantes de *tor2* y *trk1,2*. Los datos muestran que en ausencia de actividad de Tor2 presenta mucha más acumulación de potasio ya que al no estar TORC2 el canal TRK está siempre activado, cuando no está ni el complejo ni dicho canal hay menor cantidad de potasio pero se comporta muy similar al control. Por tanto demostramos la hipótesis inicial ya que existe una interacción entre el complejo 2 de TOR y el canal de transporte de potasio Trk1,2, aunque aun no queda claro la forma de interacción de los componentes de la ruta.

Por último, una de las principales funciones de TORC2 es la regulación de la polarización del citoesqueleto de actina. Los estudios de visualización del citoesqueleto en un mutante *tor2* muestran una despolarización de éste y esto no es así cuando hay un triple mutante *trk1,2 tor2*, por lo que la mutación del canal de transporte de potasio corrige dicho fenotipo aberrante y este mutante deja de ser letal.

Gracias a la literatura sobre el mutante *ppz1,2* y su relación con la ruta de PKC hemos podido relacionar a Tor2 con Trk1,2 debido a la gran similitud de fenotipos. Hemos demostrado que la mutación de *trk1,2* suprime la letalidad condicional de los componentes esenciales del complejo TORC2 y que el principal problema de estos mutantes es que al tener la toma de potasio por Trk1,2 constitutivamente activada no pueden hacer frente a la elevada presión de turgencia.

Cuando se pierde la función de TORC2 se produce un fenotipo aberrante en que se despolariza el citoesqueleto de actina, aunque no se ha encontrado ninguna relación a nivel molecular entre TORC2 y el citoesqueleto. Podemos suponer que la despolarización del citoesqueleto no es una diana de regulación de TORC2, sino una consecuencia de la hiperactivación de Trk1,2. Para confirmar esta hipótesis realizamos un segundo experimento de tinción del citoesqueleto con mutantes *mpk1* y *ppz1,2*. Como se ha dicho en los resultados, Mpk1 es una proteína quinasa implicada en la señalización dependiente de PKC, de forma que el mutante de este gen tiene una pared celular debilitada. El mutante *ppz1,2* tiene sobreactivada la toma de potasio dependiente de Trk1,2.

Los resultados muestran que los dos mutantes son viables, pero la combinación de los dos es letal. Se produce una lisis celular ya que el mutante presenta la pared celular debilitada y una mayor actividad de toma de potasio. Esta cepa es viable si se crece en una concentración de sorbitol de 1M. La hipótesis sería que si crecemos el triple mutante *ppz1,2 mpk1* en sorbitol y lo pasamos a un medio sin sorbitol, en el que no es viable, uno de los efectos de esta falta de viabilidad será la despolarización del citoesqueleto.

Por tanto es muy probable que la sobreactivación de Trk1,2 correlaciona con una despolarización del citoesqueleto de actina.

CONCLUSIONES

En el presente proyecto hemos demostrado que:

1. Existe una regulación a nivel de actividad de la proteína Pma1 por parte de la ruta TOR mediada posiblemente por fosforilación del dominio regulador C-terminal de la H⁺-ATPasa.
2. La proteína no esencial del complejo TORC1 Tco89 es un regulador negativo de la H⁺-ATPasa.
3. TORC2 es un regulador negativo del transportador de potasio de alta afinidad TRK, codificado por los genes *TRK1* y *TRK2*.
4. La sobreactivación de Trk1,2 correlaciona con una despolarización del citoesqueleto de actina y puede explicar los fenotipos de pérdida de función de TORC2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ambesi, A *et al.* Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. **J. Exp. Biol.** (2000) 203:155–160.
2. Ariño, J *et al.* Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** (2010) 95–120.
3. Aronova, S *et al.* Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. **Cell Metab.** (2008) 7:148–158.
4. Back, T and Hall, MN. The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature** (1999) 402: 689-92.
5. Bertl A *et al.* Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. **Biochimica et Biophysica Acta** (2002).
6. Bickle, M *et al.* Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. **EMBO J.** (1998) 17:2235–2245.
7. Brachmann *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S188C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast** (1998).
8. Briskin, DP. The plasma membrane H⁺ -ATPase of higher plant cell: Biochemistry and transport function. **Biochimica et Biophysica Acta.** (1990) 1019:95-109.
9. Cabedo, M. Caracterización de la regulación de la protón ATPasa PMA1 por parte de la ruta TOR en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (2011) ETSIA-UPV.
10. Cybulski, N and Hall, MN. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. **Trends Biochem. Sci.** (2009) 34: 12.
11. Gaber, RF *et al.* TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** (1988) 8:2848–2859.
12. Hayashi, T *et al.* Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe tor2* mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. **Genes Cells** (2007) 12:1357-1370.
13. Helliwell, S.B. The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signaling from Tor2 to the actin cytoskeleton. **Curr. Biol.** (1998) 1211–1214.

14. Helliwell, SB *et al.* TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** (1998) 148(1):99-112.
15. Kamada, Y *et al.* Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. **Mol. Cell. Biol.** (2005) 25:7239–7248.
16. Klionsky, DJ *et al.* The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. **Microbiol. Rev.** (1990) 54:266–292.
17. Ko, CH *et al.* TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** (1990) 125:305–312.
18. Loewith, R *et al.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol. Cell** (2002) 10:457–468.
19. Madrid, R *et al.* Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *S. cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. **JBC.** (1998).
20. Matsuo, T *et al.* Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. **Mol. Cell. Biol.** (2007) 27:3154-3164.
21. Merchan, S *et al.* Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 Mitogen-Activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. **Eukaryotic Cell** (2004).
22. Mulet, JM *et al.* A Novel Mechanism of Ion Homeostasis and Salt Tolerance in Yeast: The Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. **Molecular and Cellular Biology** (1999) Vol. 19, No 5.
23. Mulet, JM *et al.* Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. **J. Biol. Chem.** (2006) 281 (44):33000.
24. Oh, WJ *et al.* mTORC2 can associated with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. **EMBO J.** (2010) 29: 3939-51.
25. Portillo, F and Serrano, R. Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. **EMBO J.** (1988) 7: 1793-8.
26. Proft, M and Struhl, K. MAP Kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. **Cell** (2004).

27. Reinke, A *et al.* TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** (2004) 279:14752–14762.
28. Rodríguez-Navarro, A and Ramos, J. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** (1984) 159:940–945.
29. Rodríguez-Navarro, A. Potassium transport in fungi and plants. **Biochim. Biophys. Acta** (2000) 1469:1–30.
30. Rudolph, HK *et al.* The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. **EMBO J.** (1995).
31. Serrano, R and Villalba, JM. Bomba de protones de la membrana vegetal. **Investigación y ciencia** (1993) 196: 62-69.
32. Serrano, R. H⁺-ATPase from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa*; purification and reconstitution. **Methods. Enzymol.** (1988) 157: 533-544.
33. Serrano, R. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. **Biochim. Biophys. Acta.** (1988) 947: 1-28.
34. Soulard, A *et al.* TOR signaling in invertebrates. **Curr. Opin. Cell Biol.** (2009) 21:825–836.
35. Stanfel, MN *et al.* The TOR pathway comes of age. **Biochimica et Biophysica Acta** (2009).
36. Sturgill, TW *et al.* TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. **Eukaryot. Cell** (2008) 7:1819–1830.
37. Sussman, MR and Harper, JF. Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. **Plant Cell** (1989) 1:953-960.
38. Vézina, C *et al.* Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. **J. Antibiot.** (1975) 28, 10:721–6.
39. Wallis, JW *et al.* A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. **Cell** (1998).
40. Woo, SY *et al.* PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. **J. Biol. Chem.** (2007) 282:25604–25612.

41. Wullschleger, S *et al.* Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **J. Biol. Chem.** (2005) 280:30697–30704.
42. Wullschleger, S *et al.* TOR signaling in growth and metabolism. **Cell** (2006) 124:471-484.
43. Yenush, L *et al.* The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: Implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. **EMBO** (2002).
44. Zhu, JK. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Curr. Opin. Plant Biol.** (2003) 6:441-445.