

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. Homeostasis iónica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
2. El transporte de potasio en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
3. Las proteínas quinasas Hal4 y Hal5.....	8
4. Regulación de los transportadores de la membrana plasmática .....	10
II. OBJETIVOS.....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
1. Cultivo y manipulación celular .....	23
1.1. Bacterias .....	23
1.2. Levaduras .....	23
1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos).....	24
1.2.2. Ensayos de crecimiento en medio líquido .....	25
2. Técnicas de transferencia génica.....	26
2.1. Transformaciones en bacteria .....	26
2.2. Transformaciones en levadura .....	26
3. Técnicas de manipulación genética .....	27
3.1. Generación de plásmidos .....	27
3.2. Generación de la cepa mutante <i>hal4hal5npi1</i> .....	28
4. Obtención de extractos proteicos.....	29
4.1. Obtención de extractos proteicos de la célula completa.....	29
4.2. Obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble.....	29

5. Electroforesis y técnicas de detección de proteínas .....	30
5.1. Electroforesis de proteínas .....	30
5.2. Transferencia a membrana .....	30
5.3. Tinción de membranas con Ponceau S .....	30
5.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas .....	30
6. Genómica funcional.....	32
6.1. Extracción de ARN de levaduras .....	32
6.2. Marcaje de los ARNs de levadura .....	32
6.3. Hibridación de las micromatrices .....	33
6.4. Análisis de las micromatrices.....	33
6.5. Análisis <i>Northern</i> .....	34
7. Otras medidas fisiológicas .....	35
7.1. Medidas <i>in vivo</i> del pH interno de las células de levadura .....	35
7.2. Medidas del número de células y del tamaño celular .....	35
7.3. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa .....	36
7.4. Medidas de potasio por HPLC .....	36
7.5. Medidas de toma de rubidio.....	37
7.6. Medidas de toma de leucina y metionina en células de levadura.....	37
7.7. Ensayos de actividad succinato-deshidrogenasa (SDH).....	38
7.8. Microscopia confocal .....	38
7.9. Tinción de vacuolas .....	38
IV. RESULTADOS .....	39
Parte I: Análisis fisiológico y transcriptómico del mutante <i>hal4hal5</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
1. Antecedentes .....	43
2. Ensayos de crecimiento en medio líquido del mutante <i>hal4hal5</i> .....	44

3. Medidas de la concentración intracelular de potasio en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	47
4. Experimentos con una versión truncada de Trk1 .....	48
5. Medidas <i>in vivo</i> del pH intracelular en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	50
6. Medidas de la toma de leucina en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	53
7. Medidas de la actividad de la ruta GCN en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	56
8. Análisis transcriptómico del mutante <i>hal4hal5</i> .....	58
9. Metabolismo aeróbico en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	64
10. Toma de metionina en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	67

Parte II: Estudio de la interacción entre las quinasas Hal4 y Hal5, y el sistema de transporte de potasio de alta afinidad Trk1-Trk2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	69
---	----

1. Localización subcelular de la proteína Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	71
2. Efecto de la presión osmótica sobre la estabilidad y/o localización del transportador Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	75
3. Efecto de la sobreexpresión de <i>HAL5</i> sobre la estabilidad de Trk1 en la membrana plasmática .....	77
4. Efecto de la doble mutación <i>hal4hal5</i> sobre otros transportadores de la membrana plasmática .....	79
5. Análisis de la estabilidad de la versión truncada de Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	85
6. Análisis de la estabilidad de otros transportadores de la membrana plasmática en células que expresan la versión truncada de Trk1 .....	86

V. DISCUSIÓN .....	91
--------------------	----

VI. CONCLUSIONES .....	105
------------------------	-----

VII. BIBLIOGRAFÍA .....	109
-------------------------	-----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
----------------------------------	-----

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS .....	123
ANEXO I.....	125
Genes seleccionados como inducidos o reprimidos en los distintos experimentos de análisis global de la expresión génica .....	125



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Representación esquemática de los transportadores TRK-HKT .....	5
Figura 1.2. Modelo de regulación del sistema de transporte de potasio Trk1 .....	8
Figura 1.3. Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9

### MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo .....	23
Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados en este trabajo .....	31

### RESULTADOS

Figura 4.1. Ensayos de crecimiento en medio líquido.....	46
Tabla 4.2. Concentración intracelular de potasio en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre .....	47
Figura 4.3. Análisis de los fenotipos del mutante <i>hal4hal5</i> expresando una versión truncada de Trk1.....	49
Figura 4.4. Medidas de pH intracelular en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre .....	51
Figura 4.5. Medidas de pH intracelular en el mutante <i>hal4hal5</i> expresando la versión silvestre <i>TRK1</i> y la versión truncada <i>TRK1<math>\Delta</math>35</i> .....	52
Figura 4.6. Toma de leucina en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre en medio rico.....	54
Figura 4.7. Toma de leucina en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre en medio mínimo.....	55
Figura 4.8. Actividad de la ruta GCN en células crecidas en medio rico YPD .....	57

Figura 4.9. Actividad de la ruta GCN en células crecidas en medio rico YPD pH 4.5 y medio rico YPD.....	58
Figura 4.10. Comparación entre el número de genes inducidos y reprimidos en el mutante <i>hal4hal5</i> en los fondos genéticos BY4741 y W303 .....	60
Figura 4.11. Categorías funcionales sobre-representadas entre los genes seleccionados como inducidos en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	62
Figura 4.12. Categorías funcionales sobre-representadas entre los genes seleccionados como reprimidos en el mutante <i>hal4hal5</i> .....	63
Figura 4.13. Análisis de la morfología de la mitocondria en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre .....	65
Figura 4.14. Medidas de la actividad SDH en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre .....	66
Figura 4.15. Medidas de los niveles de expresión de los genes <i>SDH2</i> y <i>COX6</i> en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre .....	67
Figura 4.16. Toma de metionina en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre.....	68
Figura 4.17. Trk1 es menos estable en el mutante <i>hal4hal5</i> después del ayuno de potasio.....	73
Figura 4.18. Toma de rubidio en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre .....	74
Figura 4.19. La acumulación en la vacuola de Trk1 no es debida a los cambios en la presión osmótica producidos durante el ayuno de potasio .....	76
Figura 4.20. La sobre-expresión de <i>HAL5</i> conduce a la acumulación de Trk1 en la membrana plasmática .....	78
Figura 4.21. Localización subcelular de los transportadores / permeasas de nutrientes en las cepas silvestres, <i>hal4hal5</i> y <i>trk1trk2</i> .....	81
Figura 4.22. Análisis <i>Western</i> de la proteína Fur4 en la fracción insoluble.....	82
Figura 4.23. Localización subcelular de la permeasa Gap1 y de la proteína estructural de la membrana plasmática Sur7 .....	83
Figura 4.24. Una reducción en la expresión de Rsp5 conduce a un descenso de la cantidad de Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i> y no corrige sus defectos de crecimiento .....	84

Figura 4.25. Análisis <i>Western</i> de las versiones silvestre y truncada de la proteína Trk1 .....	85
Figura 4.26. Localización subcelular de los transportadores / permeasas de nutrientes en el mutante <i>hal4hal5</i> expresando las versiones silvestre y truncada de <i>TRK1</i> .....	87
Figura 4.27. Requisitos para el crecimiento del mutante <i>hal4hal5</i> .....	88