

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Regulación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura por la proteína kinasa TOR, la proteína fosfatasa Sit4 y la proteína de unión a RNA Ssd1.

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: Cristina Trujillo del Río

TUTOR: Prof. Ramón Serrano Salom

Curso 2015-2016

Valencia, julio de 2016



Datos personales

Nombre y apellidos: Cristina Trujillo del Río

Datos del trabajo fin de grado

Título: Regulación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura por la proteína quinasa TOR, la proteína fosfatasa Sit4 y la proteína de unión a RNA Ssd1.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor: Prof. Ramón Serrano Salom

Lugar y fecha de lectura: Valencia, julio 2016

Resumen

La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Pma1) regula el crecimiento celular por energizar la entrada de nutrientes y por modular el pH intracelular y extracelular (junto con el transporte de potasio). Los principales factores que regulan su actividad son la fuente de carbono (se activa por glucosa, que induce en levadura un crecimiento rápido con metabolismo fermentativo) y el pH del medio (el pH ácido externo activa). La activación va unida a doble fosforilación de Ser-911 y Thr-912 en el dominio inhibidor carboxi-terminal de la enzima pero se desconocen las kinasas y fosfatasa involucradas así como el papel de otros sitios de fosforilación como la Ser-507. En este proyecto se ha estudiado la actividad de Pma1 en cepas con mutaciones nulas en los genes *SSD1*, *SIT4* y *TCO89*. La proteína de unión a RNA Ssd1 ha sido identificada como un factor positivo para el crecimiento celular y para la tolerancia a acidificación intracelular y presenta letalidad sintética con la proteína fosfatasa Sit4. Tco89 es una subunidad de la proteína quinasa TORC1, un regulador maestro del crecimiento celular que está hiperactivado en células cancerosas. El papel de TORC1 en la actividad de Pma1 se ha investigado con el inhibidor específico rapamicina en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*, y con el efecto de temperatura no permisiva en un mutante termosensible de TOR. Todas estas proteínas reguladoras tienen en común el promover el crecimiento y división celular, probablemente a través de aumentar el pH intracelular mediante activación de Pma1 y del transporte de potasio (Sit4 y TORC1). También podrían reforzar sistemas celulares inhibidos por acidificación intracelular (Ssd1). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existe una regulación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática por parte de la ruta TOR y la fosfatasa Sit4. Estos estudios con el sistema de levadura sirven de modelo para la homeostasis del pH intracelular en el crecimiento rápido de células tumorales.

Palabras clave

Regulación; bomba de protones; fosforilación; crecimiento; actividad ATPasa; mutante termosensible.

Abstract

Yeast plasma membrane H⁺-ATPase (Pma1) regulates cell growth by energizing nutrient uptake and modulating intracellular and extracellular pH (together with potassium transport). Main factors regulating Pma1 are carbon source (glucose activates and induces fast growth and fermentative metabolism) and external acid pH. Activation of Pma1 correlates with double phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 within the inhibitory carboxy-terminal domain of the enzyme. The nature of the protein kinases and phosphatase involved in this phosphorylation as well as the role of other phosphorylation sites such as Ser507 are not known. This project has investigated the activity of Pma1 in strains with null mutations in the genes *SSD1*, *SIT4* and *Tco89*. The RNA-binding protein Ssd1 has been identified as a positive factor for cell growth and for tolerance to intracellular acidification and it exhibits synthetic lethality with protein phosphatase Sit4. Tco89 is a subunit of protein kinase TORC1, a master regulator of growth that is hyper-activated in cancer cells. The role of TORC1 in Pma1 activity has been investigated with the specific inhibitor rapamycin and with the effect of non-permissive temperature in a thermosensitive mutant of TOR. All these regulatory proteins have in common to promote cell growth and division, probably by increasing intracellular pH by activating Pma1 and potassium transport (Sit4 and TORC1). They could also reinforce cellular systems inhibited by intracellular acidification. Our results suggest that there is a regulation of the H⁺-ATPase of the plasma membrane by TOR and protein phosphatase Sit4. These studies with the yeast system serve as a model for the homeostasis of intracellular pH during the fast growth of tumor cells.

Key words

Regulation; proton pump; phosphorylation; growth; ATPase activity; thermosensitive mutant.

AGRADECIMIENTOS

Después de varios meses realizando este trabajo de investigación en el laboratorio 1.10 del IBMCP, quiero expresar mi agradecimiento a mi tutor Ramón y a Mariche, por haberme propuesto el tema de investigación, por haber guiado mis primeros pasos como investigadora y por el cariño con el que me habéis tratado. Gracias a ellos y a todos los demás miembros del laboratorio, que siempre me han ayudado en lo que he necesitado, he podido ampliar mis conocimientos y, sobre todo, ponerlos en práctica. Una mención muy especial va para Lola, por acompañarme y guiarme desde el primer día en esta aventura científica. Gracias por ayudarme siempre con una sonrisa. Por otro lado, deseo mencionar aquí a todos mis amigos, tanto de Valencia como de Tenerife, que siempre han estado ahí para apoyarme en el camino. Por último, quiero agradecer a mis padres y mi hermana por todo lo que me han enseñado y por creer en mi.

Gracias a todos por vuestra ayuda y apoyo, sin el cual este trabajo de fin de grado no hubiera sido posible.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	1
1.2. H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura	1
1.3. Tipos de ATPasas	2
1.4. ATPasas de tipo P	3
1.5. Regulación de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura	5
1.6. Proteínas kinasas y fosfatasas	6
1.7. Proteína fosfatasa Sit4	6
1.8. Proteína de unión a RNA SSD1	7
1.9. La ruta TOR	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3.2. Plásmidos de levadura	11
3.3. Medios y condiciones de cultivo	12
3.3.1. Medio YPDA para levadura	12
3.3.2. Condiciones de cultivo	12
3.4. Aislamiento de las membranas de levadura y determinación de la actividad de Pma1 <i>in vitro</i>	12
3.4.1. Aislamiento de las membranas de levadura	12
3.4.2. Determinación de la cantidad de proteína por el método de Bradford	13
3.4.3. Determinación de la actividad enzimática de Pma1	13
3.4.4. Cálculo de la actividad ATPasa	13
3.5. Ensayo de acidificación extracelular	14
3.6. Efecto de la rapamicina sobre la actividad de Pma1	14
3.7. Mutante termosensible	14
3.8. Análisis <i>Western blot</i>	15
3.8.1. Preparación de las muestras	15
3.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	15
3.8.3. Transferencia	16
3.8.4. Tinción con Direct Blue	16
3.8.5. Inmunodetección	16

4. RESULTADOS	17
4.1. Actividad enzimática de Pma1 en los diferentes genotipos	17
4.1.1. Mutantes con pérdida de función	18
4.1.2. Mutantes con ganancia de función	21
4.2. Regulación de la actividad enzimática de Pma1 por parte de la kinasa TOR	23
4.2.1. Efecto de la rapamicina en el crecimiento de las cepas	23
4.2.2. Efecto de la rapamicina en la actividad enzimática de Pma1	25
4.2.3. Mutante termosensible de TOR	26
4.3. Análisis por <i>Western Blot</i> de proteínas de membrana	28
4.3.1. Cantidad total de Pma1	28
4.3.2. Nivel de fosforilación de Pma1	29
5. DISCUSIÓN	30
5.1. Sit4 pero no Ssd1 regula la actividad de Pma1	30
5.2. TORC1 regula la actividad de Pma1	31
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> empleadas en este trabajo	11
Figura 1. Esquema de la homeostasis de pH en levaduras	2
Figura 2. Modelo de la estructura de Pma1	4
Figura 3. Ciclo catalítico de la H ⁺ -ATPasa	5
Figura 4. Esquema de los dominios conservados de TOR	8
Figura 5. Estructura de los complejos TORC1 y TORC2 de <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 6. Esquema de la reacción colorimétrica del ATP con el molibdato sódico	13
Figura 7. Cambios de pH inducidos por glucosa en suspensiones con distintas cantidades de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	17
Figura 8. Velocidad de bombeo de protones en suspensiones con distintas cantidades de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> BY4741	18
Figura 9. Actividad enzimática <i>in vitro</i> de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> <i>ssd1Δ</i> , <i>sit4Δ</i> y <i>tco89Δ</i> comparadas con su control BY4741.....	19
Figura 10. Cambios de pH de las suspensiones de cepas de <i>S. cerevisiae</i> inducidos por glucosa	20
Figura 11. Velocidad de bombeo de protones de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> <i>ssd1Δ</i> , <i>sit4Δ</i> y <i>tco89Δ</i> en comparación con su control BY4741	20
Figura 12. Actividad enzimática <i>in vitro</i> de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> RS-132+p987- <i>SSD1v</i> comparada con su control RS-132+p987	21
Figura 13. Ensayo de acidificación extracelular de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> RS-132+p987- <i>SSD1v</i> comparada con su control RS-132+p987.....	22
Figura 14. Crecimiento de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 a distintas concentraciones de rapamicina	23
Figura 15. Crecimiento de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> <i>fpr1Δ</i> a distintas concentraciones de rapamicina.....	24
Figura 16. Crecimiento de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> <i>sit4Δ</i> a distintas concentraciones de rapamicina.....	24
Figura 17. Actividad enzimática <i>in vitro</i> de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 y <i>fpr1Δ</i> tratadas y sin tratar con rapamicina	25
Figura 18. Actividad enzimática <i>in vitro</i> de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> <i>sit4Δ</i> tratada y sin tratar con rapamicina.....	26
Figura 19. Crecimiento a 37°C de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> SH221 (<i>tor1Δ tor2^{ts}</i>) y su control SH100.....	27

Figura 20. Crecimiento a 25°C de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> SH221 (<i>tor1Δ tor2^{ts}</i>) y su control SH100	27
Figura 21. Actividad enzimática <i>in vitro</i> de la cepa SH221 (<i>tor1Δ tor2^{ts}</i>) y su control SH100 a 25°C y 37°C	28
Figura 22. Resultados <i>Western blot</i> con el anticuerpo nº 838	29
Figura 23. Resultados <i>Western blot</i> con el anticuerpo α -pSpT	29
Figura 24. Modelo propuesto para la activación de Pma1 por parte de TORC1 y Sit4 ..	32

1. INTRODUCCIÓN.

La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura (Pma1) es una enzima crucial para el crecimiento y el metabolismo de las levaduras. Se han realizado estudios acerca de la regulación de esta enzima. Sin embargo, los sistemas que regulan su actividad no han sido completamente dilucidados. Como la mayoría de proteínas de células eucariotas están reguladas por fosfatasa y kinasa, en este trabajo se ha estudiado el papel de una proteína fosfatasa (Sit4), una proteína de unión a RNA redundante con Sit4 (Ssd1) y una proteína kinasa (TORC1) de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex. E.C. Hansen en la regulación de Pma1. Todas ellas, al igual que Pma1, regulan el crecimiento celular.

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

S. cerevisiae es un hongo unicelular ascomiceto utilizado en la fabricación de pan, vino y cerveza. Se trata de un sistema modelo simple adecuado para estudios de biología molecular.

Entre las ventajas técnicas de este organismo modelo destaca su corto tiempo de generación (90 min en medio rico complejo y 140 min en medio sintético pobre), fácil réplica en placa, la temperatura de crecimiento por lo general es de 28-30°C y puede ser manejado con mínimas precauciones, ya que no es patógeno. Por otra parte, fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado y anotado y actualmente es el genoma eucariota mejor conocido y se mantiene en constante revisión. Esto permite la manipulación genética de los más de 6000 genes que codifican su genoma, además del fácil aislamiento de mutantes y un sistema de transformación de DNA muy versátil y sencillo.

Se puede encontrar en dos fases biológicas estables: haploide y diploide. Una levadura haploide posee 16 cromosomas con un tamaño entre 200 y 2200 kb. En la fase haploide se pueden aislar y caracterizar mutantes de una manera sencilla; mientras que en la diploide se pueden llevar a cabo estudios de complementación.

S. cerevisiae es el único organismo del que existe una colección completa de mutantes por delección (Giaever *et al.*, 2002). Esta colección se ha utilizado en una amplia gama de ensayos. Uno de los argumentos más poderosos de la utilidad de la levadura como modelo en estudios de biología de sistemas viene de la utilización y aplicación de esta colección de mutantes para entender la función de los genes, las interacciones genéticas y las interacciones entre los genes y el medio ambiente (Giaever y Nislow, 2014). Por otro lado, también se han construido colecciones de mutantes de ganancia de función (Sopko *et al.*, 2006).

1.2. H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura.

Pma1 es una bomba de protones que pertenece a la familia de ATPasas de tipo P. Es un polipéptido de aproximadamente 100 kDa anclado en la bicapa lipídica por 10 α -hélices transmembrana (Serrano, 1985). Está codificada por dos genes; *PMA1* es esencial para la viabilidad y crecimiento de las cepas de levadura (Serrano, 1986; Schlessner *et al.*, 1988) y *PMA2*, aunque codifica una proteína funcional (Pma2p), se expresa a niveles muy bajos y no es esencial para el crecimiento.

Las H^+ -ATPasas de las membranas plasmática y vacuolar (Pma1 y VMA) constituyen el mayor sistema celular para la regulación del pH y la absorción de nutrientes. Estas dos importantes funciones explican la correlación entre la actividad de la enzima y el crecimiento de la levadura, observada en varios estudios (Serrano *et al.*, 1986; Portillo y Serrano, 1989; Vallejo y Serrano, 1989). Como se ilustra en la figura 1, Pma1 energiza la membrana plasmática mediante la expulsión de H^+ , lo que genera un potencial eléctrico de membrana (positivo en el exterior) y un gradiente de pH (ácido en el exterior). Esto produce un flujo activo de entrada de nutrientes y salida de aniones e iones sodio, los cuales son tóxicos para la célula. Para neutralizar la carga negativa del interior de la célula, es necesario un balance eléctrico que ocurre a través de la entrada de K^+ gracias a las proteínas transportadoras Trk1 y 2 (Madrid *et al.*, 1998). También regula el pH intracelular (pH_i) y extracelular para que se produzca el crecimiento celular y la acidificación externa, respectivamente (Serrano, 1985). Valores altos de pH_i (dentro del rango fisiológico normal) favorecen el crecimiento y proliferación celular. Un ejemplo destacado son las células cancerosas, que tienen un pH_i mayor que el de las células normales (Reshkin *et al.*, 2014). Esta alteración provoca el crecimiento activo de las mismas (Perona y Serrano, 1988).

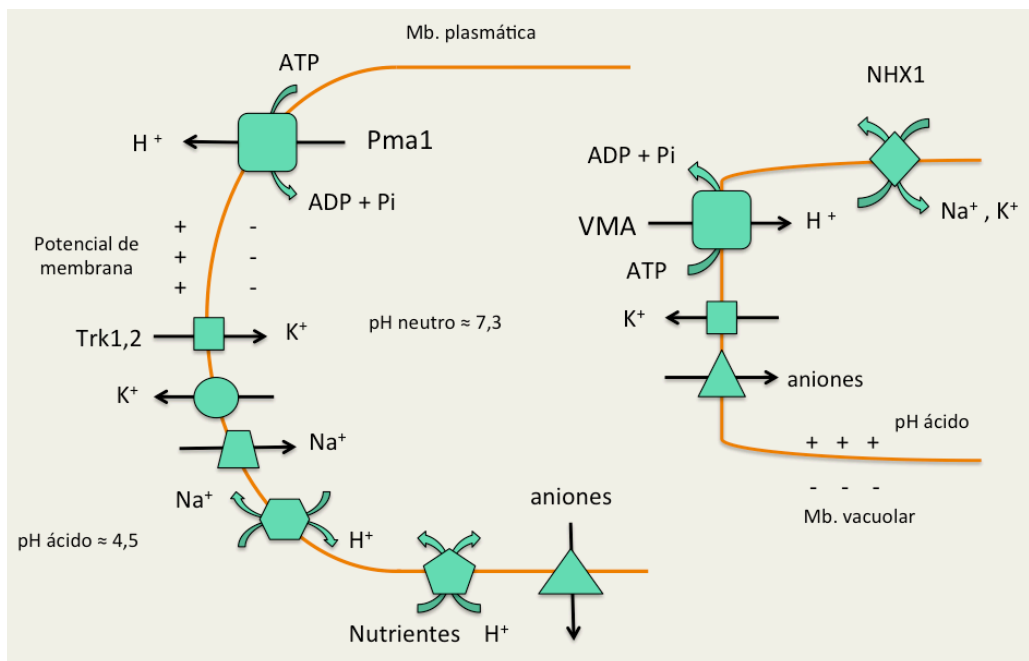


Figura 1. Esquema de la homeostasis de pH en levaduras. Los componentes de la membrana plasmática son la H^+ -ATPasa (Pma1), el canal de K^+ (Trk1,2) y los co-transportadores y simportadores de protones. En la membrana vacuolar se encuentra la H^+ -ATPasa (VMA) y los canales de K^+ y aniones. Pma1 emplea la energía de la hidrólisis de ATP para bombear protones fuera de la célula. Como consecuencia, se genera un gradiente de pH (ácido en el exterior) y un potencial de membrana (positivo en el exterior). La H^+ -ATPasa de la vacuola (VMA) aporta energía a la membrana vacuolar generando un gradiente de pH (ácido en el interior) y un potencial de membrana (positivo en el interior).

1.3. Tipos de ATPasas.

Las ATPasas son una importante familia de enzimas que emplean la energía de la hidrólisis del ATP para transportar solutos en contra de su potencial electroquímico. Se clasifican en distintas subfamilias en base a su estructura y mecanismo de actuación. Las más importantes son: F-ATPasas, V-ATPasas, ABC-ATPasas y P-ATPasas (Berg *et al.*, 2002).

Las F-ATPasas y V-ATPasas son similares estructuralmente. Son enzimas complejas formadas por más de ocho subunidades diferentes y se encargan de transportar protones. Las F-ATPasas se localizan en la membrana de las bacterias y en orgánulos eucarióticos (mitocondria y cloroplastos). Por el contrario, las V-ATPasas se encuentran en la vacuola y en diferentes vesículas (aparato de Golgi, lisosomas, endosomas), y se encargan de la acidificación de dichos compartimentos.

Las ABC-ATPasas participan en el transporte de iones, azúcares, péptidos, polisacáridos e incluso proteínas.

Las ATPasas de tipo P forman un intermediario fosforilado durante el ciclo de transporte y son sensibles al vanadato, un análogo del fosfato que inhibe enzimas con intermediario fosforilado.

1.4. ATPasas de tipo P.

Las ATPasas de tipo P comprenden una importante familia de enzimas homólogas de origen eucariota y procariota que están implicadas en el bombeo activo de iones (H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , y Mg^{2+}) a través de las membranas celulares y, por tanto, son de vital importancia en todos los seres vivos.

Están presentes en todas las especies, desde bacterias hasta mamíferos. Sin embargo, en plantas y hongos la ATPasa de membrana predominante es la H^+ -ATPasa, mientras que en células animales predomina la Na^+/K^+ -ATPasa (Serrano, 1985). La H^+ -ATPasa de levadura y otros hongos no contiene una subunidad β glicosilada como la que se encuentra en la Na^+/K^+ y la H^+/K^+ -ATPasa de mamíferos (Lutsenko y Kaplan, 1995).

Su nombre se debe a que durante el ciclo de transporte de iones el ATP cede su fosfato terminal a un resto de aspártico, formándose un intermediario fosforilado de la enzima (Pedersen y Carafoli, 1987).

El análisis filogenético de las ATPasas de tipo P muestra que esta superfamilia de proteínas se divide en 5 subfamilias distintas (P_1 - P_5) en base a su especificidad de sustrato, cada una de las cuales puede dividirse a su vez en subgrupos (Axelsen y Palmgren, 1988). La primera subfamilia (ATPasas tipo P_1) incluye bombas transportadoras de metales pesados (Cu^{2+} y Cd^{2+}) y ATPasas que participan en el transporte de K^+ . La segunda (ATPasas tipo P_2) engloba a las Ca^{2+} -ATPasas, Na^+/K^+ -ATPasas, y H^+/K^+ -ATPasas. Las ATPasas tipo P_3 abarcan bombas de H^+ y Mg^{2+} . La cuarta (ATPasas tipo P_4) está formada por enzimas que transportan fosfolípidos. Por último, las ATPasas tipo P_5 incluyen las ATPasas sin especificidad de sustrato asignada. En el genoma de *S. cerevisiae* se encuentran 16 genes de ATPasas tipo P pertenecientes a todas las ramas principales del árbol filogenético (Axelsen y Palmgren, 1998).

Las ATPasas de tipo P contienen seis motivos conservados y cinco dominios funcional y estructuralmente distintos, como se ilustra en la figura 2 (Serrano, 1991). Tres dominios citoplasmáticos (A, actuador; N, de unión a nucleótidos; P, de fosforilación) y dos dominios de membrana (T, transporte; S, soporte estructural). A menudo, también está presente un cuarto dominio citoplasmático, el regulador (R), que se encuentra en el extremo N o C terminal (o en ambos).

En cada ciclo catalítico, el dominio P es fosforilado por el dominio N y, posteriormente, desfosforilado por el dominio A. De este modo, el dominio N funciona como una proteína kinasa, el dominio A como una proteína fosfatasa y el dominio P actúa como sustrato para ambas proteínas (Palmgren y Nissen, 2011).

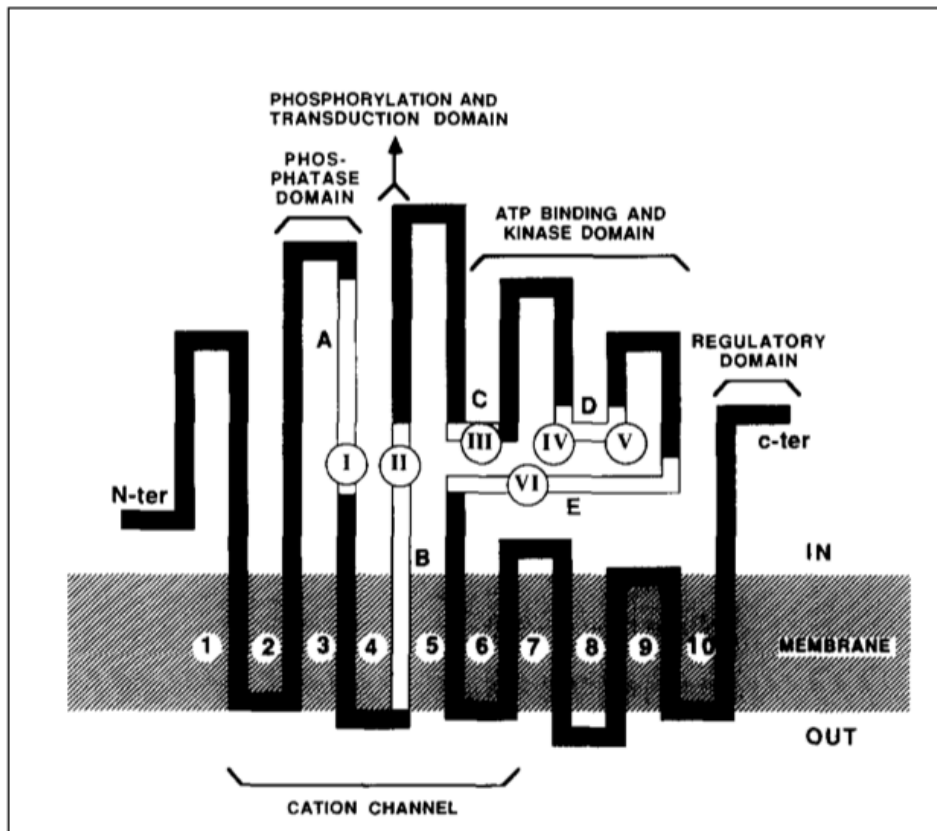


Figura 2. Modelo de la estructura de Pma1. Se indica la disposición de las 10 hélices transmembrana (1-10), los dominios funcionales (A-E) y los motivos conservados de las P-ATPasas. El motivo I (TGES) es el sitio activo del dominio de autofosforilación. El motivo II (D[K,R]TGT[L,I]T) incluye el aspartato (D) autofosforilado del intermediario de la reacción. Los motivos III (KGAP), IV (DPPR), V (M[L,I,V]TGD) Y VI (GDGXND) están involucrados en la unión del ATP (Serrano, 1991).

Se ha establecido que las ATPasas de tipo P sufren grandes cambios conformacionales durante el ciclo catalítico (Jorgensen, 1975). En un principio, se planteó un modelo que consiste en dos conformaciones diferentes (E1 y E2), cada una con una afinidad distinta por los iones transportados. Después, se propuso un modelo basado en cuatro estados conformacionales distintos (Jencks, 1989). Estos estados se representan en la figura 3.

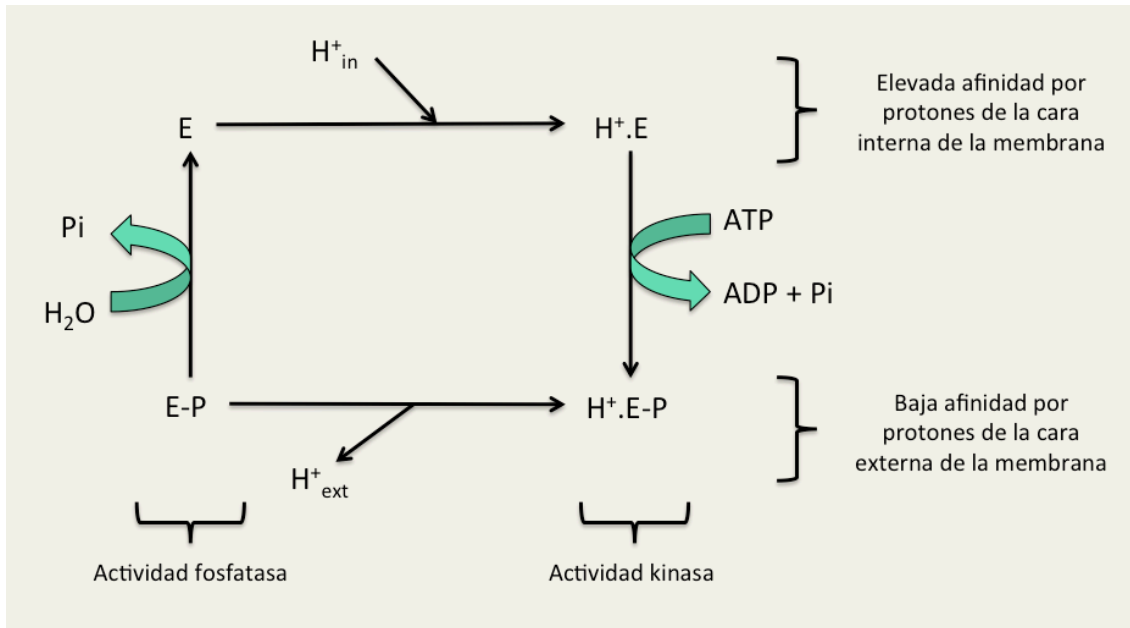


Figura 3. Ciclo catalítico de la H^+ -ATPasa. En el estado desfosforilado, el sitio de unión de H^+ del enzima está expuesto a la cara interna de la membrana y muestra una elevada afinidad. Después de la fosforilación, está expuesto a la cara externa de la membrana y exhibe una baja afinidad por los H^+ . La enzima desprotonada tiene actividad fosfatasa mientras que la enzima protonada tiene actividad kinasa (adaptada de Serrano, 1991).

1.5. Regulación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura.

En plantas y hongos, la actividad de esta bomba de protones está regulada, a nivel transcripcional y post-traducciona, por un gran número de factores ambientales (Portillo, 2000). Los dos factores principales responsables de esta regulación en *S. cerevisiae* son la glucosa (Serrano, 1983) y el pH ácido (Eraso y Gancedo, 1987). El metabolismo de la glucosa modifica las propiedades cinéticas de la enzima. Aumenta la $V_{m\acute{a}x}$ aproximadamente 3 veces, reduce la K_m (de 1,5-2 a 0,3-0,6), cambia el pH óptimo a valores más alcalinos (de 5,6 a 6-7) e incrementa la sensibilidad de la enzima a vanadato. Los azúcares metabolizados por la vía glicolítica (glucosa, fructosa y manosa) conducen a un incremento de la actividad de la proteína, mientras que los azúcares metabolizados por otras rutas (galactosa) o los análogos no metabolizables, como la xilosa, no producen ninguna mejora de la actividad (Serrano, 1983). Por otro lado, la acidificación del medio durante el crecimiento de la levadura provoca un descenso del pH citosólico y, como consecuencia, se activa Pma1. Esta activación se debe a un cambio en la K_m sin modificación de la $V_{m\acute{a}x}$ ni del pH óptimo (Eraso y Gancedo, 1987). Estos hechos parecen explicar los cambios en la actividad de Pma1 debidos al crecimiento de la levadura en distintos medios.

Otros factores que aumentan la actividad de la enzima son las condiciones de estrés que pueden ser revertidas por la actividad de la proteína; como la presencia de etanol (Rosa *et al.*, 1991), ácidos orgánicos débiles (Viegas *et al.*, 1991), elevadas temperaturas (Viegas *et al.*, 1995) y la privación de la fuente de nitrógeno (Benito *et al.*, 1992).

La regulación de la actividad de Pma1 depende de un dominio regulador presente en el extremo C-terminal (Benito *et al.*, 1992). Los últimos 21 aminoácidos de este dominio son los responsables de dicha regulación. En su estado inactivo, el dominio regulador bloquea el sitio activo de la enzima inhibiendo su actividad. Por el contrario, después de una serie de modificaciones, inducidas por el metabolismo de la glucosa o la acidificación, el dominio se desplaza y permite el acceso del ATP al sitio activo de la enzima.

En levadura, se ha sugerido que la activación de Pma1 por el metabolismo de la glucosa está mediada por la fosforilación de ciertos puntos del extremo C-terminal; algunos de los cuales se han identificado por mutagénesis dirigida. Uno de los sitios de fosforilación, definido por los aminoácidos Arg-909 y Thr-912, es esencial para que se produzca un incremento en la $V_{m\acute{a}x}$. Otro está definido por los aminoácidos Ser-899 y Glu-901 y afecta a la K_m (Eraso y Portillo, 1994). Sin embargo, el mecanismo más importante para la activación de Pma1 por el metabolismo de la glucosa, consiste en la doble fosforilación de los aminoácidos Ser-911 y Thr-912 (Portillo *et al.*, 1991; Lecchi *et al.*, 2007).

Por otra parte, Estrada *et al.* (1996) describieron otro sitio regulador de Pma1 que consiste en la fosforilación de la Ser-507 por la caseína quinasa I. Esta fosforilación inhibe la actividad de Pma1 y disminuye en presencia de glucosa.

1.6. Proteínas kinasas y fosfatasas.

La fosforilación y desfosforilación de las proteínas es uno de los mecanismos más importantes de regulación de su actividad. Es necesario la acción de dos clases de enzimas. Por un lado, las proteínas kinasas, que catalizan la fosforilación; y por otro lado, las proteínas fosfatasas, encargadas de la desfosforilación. El estado de fosforilación de las proteínas afecta a sus propiedades biológicas (conformación, localización celular, sensibilidad a modificadores) y, en consecuencia, a los procesos celulares en los que están involucradas (Berg *et al.*, 2002).

Las kinasas promueven la transferencia de grupos fosforilos desde un nucleósido trifosfato (normalmente ATP) hacia aminoácidos hidroxilados de una proteína. Se pueden clasificar en tres grupos: las que transfieren el grupo fosforilo hacia residuos de serina o treonina (Ser/Thr kinasas); hacia residuos de tirosina (Tyr kinasas) y hacia cualquiera de ellos.

Las fosfatasas catalizan la hidrólisis del enlace éster fosfórico. Se dividen en tres grandes subgrupos: las que catalizan la hidrólisis del enlace del fosfato de residuos de serina o treonina, (Ser/Thr fosfatasas); las que lo hacen sobre residuos de tirosina (Tyr fosfatasas) y las que tienen especificidad dual.

Según su especificidad de sustrato y sus propiedades farmacológicas existen dos tipos de Ser/Thr fosfatasas: PP1 y PP2. A su vez, las PP2 se dividen en tres subtipos según la dependencia de cationes para su actividad. Así, las de tipo 2A (PP2A) no necesitan ningún catión y las de tipo 2B y 2C (PP2B y PP2C) requieren Ca^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente.

1.7. Proteína fosfatasa Sit4.

La proteína fosfatasa Sit4 fue inicialmente identificada en *S. cerevisiae* por mutaciones que restauran la transcripción del gen *HIS4* en ausencia de GCN4, BAS1 y BAS2 (Arndt *et al.*, 1989). El gen *SIT4* (Supresor de Iniciación de Transcripción) codifica una proteína (Sit4) de 35,5 kDa que es 55% idéntica a la subunidad catalítica de las fosfatasas de tipo 2A (PP2A) de mamíferos y 40% idéntica a la subunidad catalítica de las fosfatasas de tipo 1 (PP1) de mamíferos (Arndt *et al.*, 1989). Sit4 participa en varios procesos celulares, tales como la respuesta a nutrientes mediada por la ruta TOR y la regulación de la homeostasis de iones monovalentes y pH_i. Además, es crucial en la regulación del ciclo celular, ya que modula la progresión de la fase G1 hasta la fase S, a través del control de la producción de ciclinas (Sutton *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha demostrado que es necesaria para la regulación de la actividad PKC y, en consecuencia, afecta a las funciones dependientes de esta quinasa, como la actividad Mpk1, la organización del citoesqueleto y la expresión de genes ribosomales (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002).

El gen *SIT4* no es esencial por lo que las cepas con mutaciones nulas son viables. Sin embargo, las cepas que contienen mutaciones de supresión transcripcional de *Sit4* crecen muy lentas (tienen defectos fermentativos y respiratorios), son termosensibles y crecen mal en medios con fuentes de carbono no fermentables (Arndt *et al.*, 1989).

Las subunidades reguladoras de Sit4 incluyen varios miembros de la familia SAP (Luke *et al.*, 1996) y una subunidad denominada Tap42, que interactúa con Sit4 cuando TORC1 está activa y se disocia de la fosfatasa cuando TORC1 está inhibida (Di Como y Arndt, 1996). Para el funcionamiento de Sit4 es necesaria la interacción con Tap42 (Wang *et al.*, 2003).

1.8. Proteína de unión a RNA Ssd1.

El gen *SSD1* (Supresor de la Delección de *SIT4*) es identificado por primera vez por Sutton *et al.* (1991). Codifica una proteína de unión a mRNA (Uesono *et al.*, 1997) de 1250 aminoácidos y 140 kDa, que es represora transcripcional y participa en el crecimiento polar y el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Además, interactúa con componentes de la ruta metabólica TOR y modula la expresión y localización de mRNAs específicos (Kurischko *et al.*, 2011).

Se pueden distinguir dos alelos de este gen. Por un lado, *SSD1-v* es dominante y suprime la letalidad debida a una mutación nula en el gen *SIT4*. Por otro lado, *ssd1-d* es recesivo y no es supresor de la mutación de *SIT4*. La delección de *SIT4* en cepas con el alelo *ssd1-d* o con delección del gen *SSD1* resulta letal (Sutton *et al.*, 1991).

Las cepas que contienen el alelo *ssd1-d* no presentan alteraciones fenotípicas fácilmente detectables en condiciones normales. Son viables pero su crecimiento es ligeramente más lento y es más sensible a múltiples sustancias, incluyendo ácidos.

1.9. La ruta TOR.

TOR es una serina/treonina kinasa perteneciente a la familia PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase*, es decir, kinasa relacionada con la fosfatidilinositol kinasa) que controla el crecimiento y metabolismo celular en respuesta a estímulos ambientales (nutrientes, hormonas y estrés). En animales y hongos, TOR (*Target Of Rapamycin*) es la diana de la rapamicina, un macrólido producido por *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen 1931) Yüntsen *et al.* 1956 que actúa inhibiendo su actividad. Este metabolito secundario se emplea como droga inmunosupresora y en el tratamiento del cáncer.

Como se observa en la figura 4, las proteínas TOR constan de los siguientes dominios, en orden del extremo N al C terminal, dominios HEAT repetidos en tándem (sitio de unión de subunidades en los complejos de TOR), el dominio FAT, el dominio FRB (sitio de unión del complejo inhibidor FKBP12-rapamicina), el dominio kinasa y el dominio FATC (Loewith *et al.*, 2011).

A diferencia del resto de eucariotas, que poseen un solo gen de TOR, en levadura existen dos genes TOR (*TOR1* y *TOR2*) que codifican dos proteínas altamente homólogas (Tor1 y Tor2) con un peso molecular de 282 kDa. De este modo, TOR puede formar parte de dos complejos multiproteicos distintos: TORC1, que es sensible a rapamicina, y TORC2, que es insensible a rapamicina. Esto se debe a que la rapamicina forma un complejo con FKBP12 (una peptidil-prolil isomerasa codificada por el gen *FPR1*) responsable de la inhibición, que se une a TORC1 pero no a TORC2 (Loewith *et al.*, 2002). *TOR2* tiene dos funciones esenciales. La primera es redundante con *TOR1* y media la síntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular mediante el complejo TORC1. La segunda es única para *TOR2* y media la organización del ciclo celular dependiente del citoesqueleto de actina mediante el complejo TORC2 (Helliwell *et al.*, 1998).

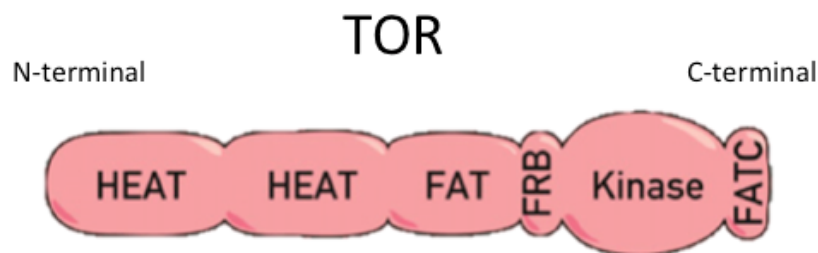


Figura 4. Esquema de los dominios conservados de TOR (adaptada de Loewith *et al.*, 2011).

Complejo TORC1.

El complejo TORC1 está formado por Kog1, Lst8, Tco89, y Tor1 o Tor2 (Loewith *et al.*, 2002; Wedaman *et al.*, 2003; Reinke *et al.*, 2004) (véase figura 5). El marcaje de estas subunidades con GFP ha demostrado que TORC1 se concentra en la membrana vacuolar.

Estudios genéticos en levadura han demostrado que TORC1 media el control temporal del crecimiento celular (Wullschleger *et al.*, 2006). Si las condiciones ambientales son favorables (presencia de nutrientes y ausencia de estrés), TORC1 favorece el crecimiento celular a través de la activación de la síntesis de proteínas, biogénesis de ribosomas y tRNA, progresión del ciclo celular y absorción de nutrientes; y detiene procesos como la autofagia o la degradación de RNA. Por el contrario, la falta de nutrientes y la exposición de las células a rapamicina se traduce en un descenso dramático en la síntesis de proteínas, la inducción de la autofagia, la salida del ciclo celular y la entrada en un estado quiescente G_0 .

TORC1 actúa a través de dos rutas principales: una está mediada por la proteína kinasa Sch9 y otra por el complejo formado por la subunidad Tap42 con Sit4 y otras fosfatasa de tipo 2A (Pph21 y Pph22) (Loewith *et al.*, 2011).

Complejo TORC2.

Como se ilustra en la figura 5, TORC2 está formado por Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y Lst8. Las subunidades TOR2, Avo1, Avo3, y Lst8 son esenciales y están altamente conservadas. Avo1 y Avo3 se unen a los dominios HEAT de la región N-terminal y son necesarias para mantener la integridad de TORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006).

Cabe destacar que la mayoría de Tor2 ($\approx 90\%$) se encuentra en TORC2 (en lugar de en TORC1), y por lo tanto los estudios de localización de Tor2 detectan principalmente, aunque no exclusivamente, TORC2. Estos estudios indican que TORC2 se localiza en el citoplasma o cerca de la membrana plasmática, lo que es consistente con el papel de TORC2 en la endocitosis y la regulación de la polarización del citoesqueleto de actina.

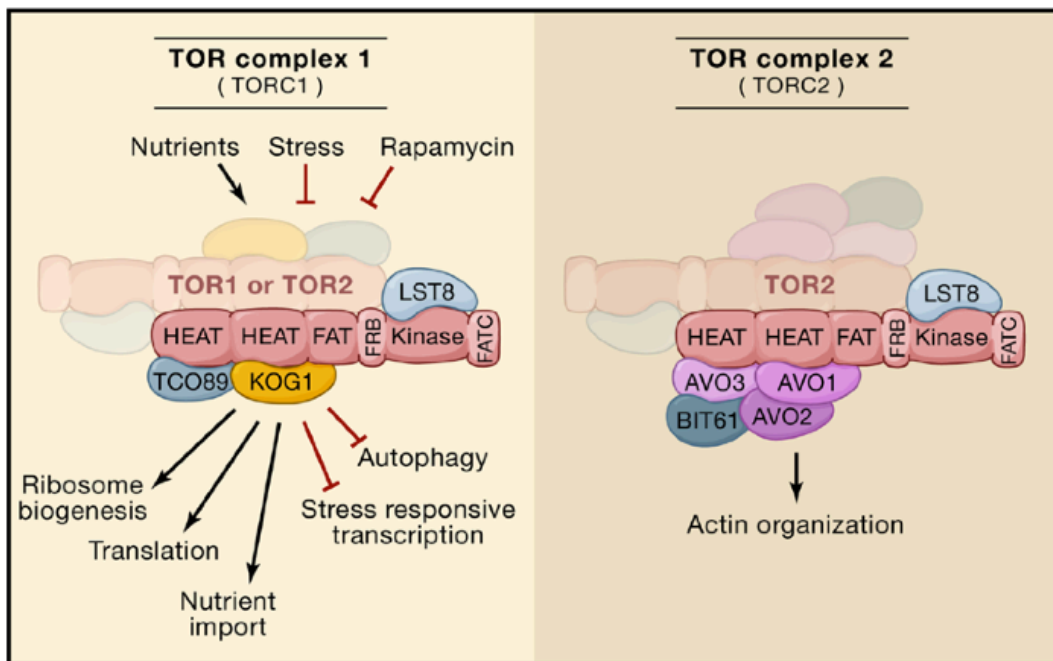


Figura 5. Estructura de los complejos TORC1 y TORC2 de *S. cerevisiae* (Wullschleger *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS.

En el presente trabajo se pretende estudiar la regulación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura por la fosfatasa Sit4, por la proteína de unión a RNA Ssd1 y por la proteína kinasa TORC1. Para ello se plantean los siguientes ensayos.

1. Evaluar la actividad enzimática *in vitro* (hidrólisis de ATP en membranas aisladas) e *in vivo* (salida de protones de las células) de Pma1 en mutantes de pérdida o ganancia de función de los genes *SIT4*, *SSD1* y *TCO89*.
2. Evaluar el efecto de la rapamicina, inhibidor de la proteína kinasa TORC1, en la actividad enzimática de Pma1.
3. Evaluar el efecto de temperatura no permisiva sobre la actividad de Pma1 en un mutante termosensible de TOR.
4. Analizar el efecto de la rapamicina en la cantidad y nivel de fosforilación de Pma1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de levadura empleadas se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Colección de Ramón Serrano	Genotipo	Referencia
RS-259	BY4741 (<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>)	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
	BY4741 <i>ssd1Δ</i>	
	BY4741 <i>sit4Δ</i>	
	BY4741 <i>tco89Δ</i>	
	BY4741 <i>fpr1Δ</i>	
RS-58	BWG1-7A (<i>MATa ade1-100 his4-519 URA3-52 leu2-3,112</i>)	Guarente <i>et al.</i> , 1982
RS-132	(<i>MATa ade1-100 his4-519 URA3-52 leu2-3,112::LEU2</i>)	Serrano, R. y Montesinos, C. (no publicado)
RS-639	RS-132 + p987	R. Serrano y C. Montesinos (no publicado)
RS-637	RS-132 + p987-SSD1-v	R. Serrano y C. Montesinos (no publicado)
RS-625	SH221 (<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 his4 HMLa ade2 his3 HIS4 tor1::HIS3 tor2::ADE2/YCplac111::tor2-21^{ts}</i>)	Helliwell <i>et al.</i> , 1998
RS-626	SH100 (<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 his4 HMLa ade2 tor2::ADE2/YCplac111::TOR2</i>)	Helliwell <i>et al.</i> , 1998

3.2. Plásmidos de levadura.

Se utiliza la cepa RS-132 transformada con dos plásmidos. Por un lado, el plásmido comercial pRS 416 de la casa Stratagene (La Jolla, California), que es un plásmido centromérico (copia simple) de 4,9 kb. Se encuentra designado en la colección de Ramón Serrano como pRS 987. Para seleccionar transformantes en levadura se emplea el marcador *URA3* y para seleccionar en *Escherichia coli* se utiliza el marcador de resistencia a ampicilina. Por otro lado se utiliza el mismo plásmido pero conteniendo un inserto del gen *SSD1-v* de 4,5 kb en el sitio BamH1.

3.3. Medios y condiciones de cultivo.

3.3.1. Medio YPDA para levadura.

El medio YPD es un medio complejo que se compone de 1% de extracto de levadura, 2% de peptona bacteriológica y 2% de dextrosa (glucosa). Si se quiere un medio sólido, se añade 2% de agar. Los mutantes *ade1* o *ade2* acumulan un pigmento rosado que inhibe el crecimiento y para evitarlo se utiliza este medio suplementado con 30 µg/ml de sulfato de adenina. El exceso de adenina inhibe el principio de la ruta metabólica y evita la acumulación del pigmento. Este medio se conoce como YPDA.

3.3.2. Condiciones de cultivo.

Las cepas de levadura crecen a una temperatura de 28°C en agitación (200 rpm), en medio completo YPDA. Los medios empleados se esterilizan en el autoclave (20 min a 120°C y 1 atm).

3.4. Aislamiento de las membranas de levadura y determinación de la actividad de Pma1 *in vitro*.

3.4.1. Aislamiento de las membranas de levadura.

Preparación del cultivo.

Se realiza un preinóculo en 2 ml de YPDA a partir de una colonia aislada. Se incuba durante 24 h a 28°C en un agitador rotatorio hasta alcanzar la fase estacionaria. Este cultivo se almacena en frío y se utiliza como inóculo madre para preparar los posteriores cultivos. Estos se preparan en matraces de 250 ml con 50 ml de YPDA y se incuban a 28°C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar la fase exponencial o la fase estacionaria, según lo requerido en cada ensayo.

Aislamiento de la membrana plasmática.

El cultivo se centrifuga durante 5 min a 3000 rpm en una centrífuga Nahita 2655. Se resuspende el pellet en 2 ml del sobrenadante. Las células concentradas se incuban durante 5 min a 30°C, se homogenizan con 400 µl de tampón de extracción 6x (0,3 M Tris-HCl pH 8, 0,3 M KCl, 30 mM EDTA), 1,6 µl de 0,5 M DTT y 80 µl de inhibidor de proteasas 25x (Complete EDTA-free, Roche) y 5 ml de bolas de vidrio congeladas de 0,5 mm de diámetro, y se agita en un agitador tipo *Vortex* durante 3 ciclos de 1 min a velocidad máxima. Posteriormente, se recupera el líquido con una micropipeta con punta azul y se pasa a dos microtubos de 1,5 ml. A continuación, se centrifugan durante 5 min a 3000 rpm y 4°C en una centrífuga Eppendorf R5415 R (elimina restos celulares, paredes y núcleos), se toma el sobrenadante y se vuelve a centrifugar 20 min a 13000 rpm y 4°C en la misma centrífuga (sedimenta mitocondrias y fragmentos de membrana plasmática). El precipitado se resuspende en 100 µl de GTED20 (20% glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA y 1 mM DTT) y se diluye con 900 µl de agua destilada fría para lisar y lavar las membranas. Después, se centrifugan 30 min a 13000 rpm y 4°C, las membranas se resuspenden con un homogenizador tipo Dounce en 200 µl de GTED20, se divide en varias alícuotas y se mantiene en la nevera.

3.4.2. Determinación de la cantidad de proteína por el método de Bradford.

Este método se basa en la cuantificación de proteínas por el cambio de color de un colorante al unirse a las proteínas (Bradford, 1976). Su ventaja principal es que resulta más sencillo, rápido y sensible que otros métodos alternativos. Se basa en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 y las proteínas a pH ácido, lo que determina un color azul. Cuanto mayor sea la cantidad de proteína en la muestra, el color azul será más intenso. La cantidad total de proteína que hay en las muestras se calcula a partir de una curva patrón, que se construye con una proteína patrón (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de γ -globulina). En una placa de 96 pocillos (Greiner), se añaden 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μl de dicha proteína. Se colocan también 3 réplicas de cada muestra ensayada (2-10 μl). Se añade 150 μl del reactivo de ensayo de proteína 5X BioRad con dilución 4:1 a cada pocillo y se deja 5 min para que el color azul se establezca. Se mide la absorbancia a 595 nm en un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (BioRad).

3.4.3. Determinación de la actividad enzimática de Pma1.

La medida de la actividad de Pma1 se basa en la cuantificación del Pi que se libera en la hidrólisis de ATP (Serrano, 1978). El Pi y el molibdeno forman fosfomolibdato en medio ácido y al reducirse por el ácido ascórbico forma complejos de color azul (véase figura 6).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizan placas de 96 pocillos (Greiner) en las que se añade 10 μg de proteínas de membrana y 65 μl de tampón de reacción (50 mM MES-Tris pH 5,7, 5 mM MgSO_4 , 50 mM KNO_3 , 5 mM azida sódica, 0,3 mM molibdato de amonio) premezclado con 0,1 M ATP pH 6,5 en proporción 50:1 (2 mM final ATP). Se realiza un control en el que se añaden las muestras, 65 μl de tampón de reacción y 0,15 mM de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4). De este modo se analiza el Pi presente en el extracto antes del ensayo y la liberación de Pi debida a otras proteínas distintas a Pma1, que es sensible a la inhibición por vanadato. Además, se construye una curva patrón con fosfato inorgánico (Pi) al que también se le añade tampón de reacción. La placa se incuba 30 min a 30°C. La reacción se para por adición de 130 μl de reactivo del fosfato (2% H_2SO_4 , 0,5% molibdato de amonio y 0,5% SDS) premezclado con 10% ácido ascórbico en proporción 100:1 (0,1% final ascórbico). Seguidamente se incuba en oscuridad durante 10 min para que el color azul se establezca y se mide la absorbancia a 750 nm en un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (BioRad).

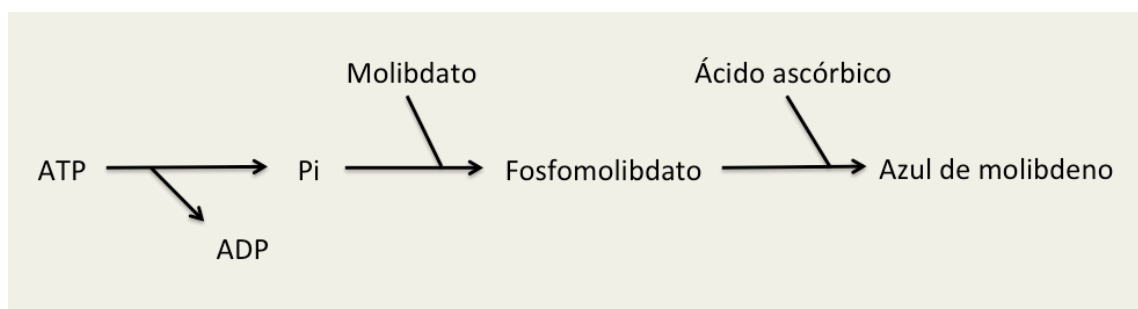


Figura 6. Esquema de la reacción colorimétrica del ATP con el molibdato sódico.

3.4.4. Cálculo de la actividad ATPasa.

A los valores de absorbancia obtenidos de cada muestra se le restan los valores del control con vanadato. Las absorbancias obtenidas en la curva patrón se pasan a nmoles de Pi (la equivalencia es del orden de 0,001 unidades de absorbancia por nmol de Pi). Se calculan los nmoles de Pi producidos por las membranas usando la ecuación de la recta patrón. Se divide

por el tiempo de reacción (30 min) y por la cantidad de proteína empleada en el ensayo (10 μg) y así se obtienen nmoles $\text{Pi} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g} \text{ proteína}^{-1}$.

3.5. Ensayo de acidificación extracelular.

Preparación del cultivo.

Se utiliza un cultivo en fase estacionaria como inóculo para un matraz de 100 ml con 20 ml de medio YPDA y se incuba a 28°C hasta que alcance la fase exponencial (absorbancia entre 2 y 4 medida con Ultrospec 10 de GE Health Care). Se centrifuga el cultivo 5 min a 3000 rpm y se resuspende en 20 ml de H₂O estéril. Se vuelve a incubar entre 1 y 2 h a 200 rpm y 28°C para que la salida de K⁺ intracelular active el sistema de entrada de K⁺. Se centrifuga el cultivo 5 min a 3000 rpm para concentrar las células, se retira el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de H₂O estéril. A continuación, se mide la absorbancia.

Medición de los cambios de pH de las suspensiones de levadura inducidos por glucosa.

La velocidad de bombeo de protones se determina midiendo los cambios de pH en suspensiones diluidas de levadura (Serrano, 1980). El medio contiene 100 mM KCl y 10 mM glicilglicina a pH 4. Se colocan 200 μl de las células de levadura en un recipiente con 2 ml de medio en agitación. Se añaden dos pulsos de calibración de 10 μl de 10 mM HCl al principio y al final del experimento. El bombeo de protones de las células se inicia por adición de 50 μl de glucosa al 20%. Para medir el pH se emplea un pHmetro GLP22 (Crison).

3.6. Efecto de la rapamicina sobre la actividad de Pma1.

Las cepas utilizadas para este ensayo fueron *sit4 Δ* , *fpr1 Δ* y su control BY4741. Primero se comprueba el fenotipo y la diferencia de crecimiento de las cepas y se establecen las condiciones del ensayo. Para ello se inoculan 60 ml de medio YPDA con un cultivo en fase estacionaria, y se incuba a 28°C en agitación (200 rpm). Cuando alcanza una absorbancia de 0,3 se separan 3 alícuotas de 20 ml en matraces de 100 ml. Al primero y el segundo se le añade rapamicina preparada en DMSO a una concentración de 0,1 μM y 0,5 μM , respectivamente. Al último no se le añade rapamicina y se utiliza como control. Se incuban en las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se mide la absorbancia a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h).

A partir de los resultados obtenidos se establecen las siguientes condiciones de ensayo: una incubación de 5 h y una concentración de 0,1 μM de rapamicina. Para la extracción y la medida de la actividad de Pma1 *in vitro* se siguen los mismos procedimientos descritos en la sección 3.4.

3.7. Mutante termosensible.

Las cepas utilizadas para este experimento fueron SH221 (*tor1 Δ tor2^{ts}*) y su control SH100. En primer lugar se comprueba la diferencia de crecimiento de ambas cepas en medio líquido para establecer las condiciones del ensayo. Se inoculan 50 ml de medio YPDA con un cultivo en fase estacionaria, y se incuba a temperatura ambiente (25°C). Cuando alcanza una absorbancia de 0,3 se separan 20 ml del cultivo anterior y se incuban a 37°C y otros 20 ml a temperatura ambiente (25°C). El crecimiento se analiza midiendo la absorbancia a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h).

A partir de los resultados obtenidos se determinó una incubación de 5 h en un baño a 37°C. También se realiza el ensayo a 25°C como control. La actividad de Pma1 *in vitro* se mide siguiendo los mismos procedimientos descritos en la sección 3.4.

3.8. Análisis *Western blot*.

3.8.1. Preparación de las muestras.

Se parte de 40 µg de proteína de membranas y se completa con 100 µl de H₂O milliQ, se añaden 200 µl de TCA al 10% (para inactivar proteasas) y se incuba 20 min en hielo. Se centrifugan las muestras 15 min a 4°C y 12000 rpm en una centrifuga Eppendorf R5415 R. A continuación, se retira el sobrenadante y se lavan las paredes del tubo con 1 ml de agua para eliminar el ácido residual. Después se deja 10 min en hielo y se centrifuga de nuevo durante 15 min en las mismas condiciones. Se elimina el sobrenadante nuevamente, se resuspende con 20 µl de tampón Laemmli 1x (1,5% SDS, 20 mM DTE, 2 mM EDTA, 6% p/v sacarosa, 0,05 mg/ml azul de bromofenol, 60 mM Tris-HCl pH 6,8) y se incuba 15 min a 37°C.

Pma1, como otras proteínas hidrofóbicas, se agrega si se calienta a más de 40-50°C en presencia de SDS. El procedimiento habitual de preparar muestras para electroforesis consiste en calentar la muestra con el tampón Laemmli durante 10-20 min a 95°C y por tanto no puede aplicarse en el caso de Pma1, debiendo utilizarse una temperatura mucho más baja. El problema es que la incubación con SDS a 95°C inactiva las proteasas de la muestra pero la incubación a temperaturas más bajas de 60-70°C activa la degradación por proteasas. Por ello en el caso de Pma1 realizamos una precipitación con TCA que inactiva las proteasas endógenas de las membranas y luego solubilizamos las proteínas con SDS a 37°C.

3.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para separar las proteínas (en función de su tamaño) se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y 1mm de grosor.

El gel tiene dos capas:

- Capa inferior (*resolving gel*): se mezclan 3 ml de *resolving buffer*, 1,2 ml de acrilamida al 8%, 1,2 ml de H₂O y para que se produzca la polimerización se añaden 40 µl de APS al 10% y 4 µl de TEMED.

Una vez preparado, se introduce entre los cristales y se añade isopropanol para nivelar la interfase y eliminar las burbujas. Una vez polimeriza se introduce la capa superior.

- Capa superior (*stacking gel*): se mezclan 0,2 ml de acrilamida 8%, 1,2 ml de *stacking buffer*, 1 ml de H₂O, 20 µl de APS al 10% y 2 µl de TEMED.

Se introduce entre los cristales, se añade el peine y se espera a que polimerice. Seguidamente se retira el peine y se lavan los pocillos con agua destilada para evitar que queden restos de sales.

A continuación, se cargan las muestras y un marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) y en los pocillos vacíos Laemmli 1x. Se añade tampón de electroforesis 1x (0,19 M glicina, SDS 0,1%, ajustado a pH 8,3 con Tris base). Se aplica una intensidad de 15 mA durante 1 h y 30 min.

3.8.3. Transferencia.

Después de separar las proteínas en el gel, se transfieren a una membrana de PVDF (antes de su utilización se hidrata con metanol 4 s). El procedimiento se realiza a un voltaje de 11 V durante toda la noche a temperatura ambiente; se utiliza el tampón de transferencia Towbin (14,4 g/l de glicina, 2 ml de 10% SDS, ajustado a pH 8,3 con Tris-base, 20% metanol).

3.8.4. Tinción con Direct Blue.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se incuba 5 min en direct blue al 0,008% [DB 71 al 0,1 % diluido con solución de lavado (500 ml H₂O, 400 ml etanol absoluto, 100 ml ácido acético glacial)]. La membrana teñida se deja durante 5 min en la solución de lavado. Después de escanear la membrana, se destiñe incubándola 5 min en solución de desteñido (350 ml H₂O, 500 ml etanol absoluto, 150 ml NaHCO₃ 1M).

3.8.5. Inmunodetección.

La membrana se incuba con una solución de bloqueo compuesta por TBS-T (0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6) y 1% BSA durante 1 h. Después, se incuba con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C y en agitación. Se prueban dos anticuerpos: α -pSpT (diluido 1:4000), que se une a la Ser-911 y Thr-912 fosforiladas del extremo C-terminal de la H⁺-ATPasa y el nº 838 (diluido 1:100000), que se une a toda la H⁺-ATPasa.

A continuación, se lava la membrana 4 veces durante 10 min con TBS-T y luego se incuba 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (anti α -rabbit Ig-HRP diluido 1:5000). Después se repiten los lavados.

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

Los dos anticuerpos primarios se prueban en la misma membrana. Para reutilizarla se incuba en la solución de *stripping* (10 ml de 1M glicina, 2 ml de SDS al 10%, 38 ml H₂O, ajustando el pH a 2,5 con 12 M HCl) 15 min en agitación, se lava, se bloquea y se vuelve a incubar con el anticuerpo deseado como se ha descrito anteriormente. Si la membrana está deshidratada se coloca 4 s en metanol.

4. RESULTADOS.

En este trabajo se ha estudiado la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura en diferentes cepas con mutaciones en genes cuyas proteínas codificadas podrían estar implicadas en la regulación de su actividad. Dado el papel esencial de la H⁺-ATPasa para el crecimiento y división celular, se han seleccionado genes de sistemas importantes para el crecimiento (*TOR1* y *TOR2*, *TCO89*) y división (*SIT4*, *SSD1*) celular. También se ha analizado la enzima en cepas con mutaciones termosensibles de TORC1 o tratadas con el inhibidor específico rapamicina.

Se realizó el estudio a tres niveles:

- Actividad de la enzima *in vitro* (hidrólisis de ATP en membranas aisladas).
- Acidificación extracelular (salida de H⁺ en células enteras).
- Cantidad y nivel de fosforilación de la enzima (*Western blot*).

Se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento, ya que en células con crecimiento exponencial la H⁺-ATPasa representa alrededor del 50% de la proteína de membrana plasmática, mientras que en fase estacionaria disminuye entre un 20-30% (Serrano, 1991).

4.1. Actividad enzimática de Pma1 en los diferentes genotipos.

En primer lugar, se midieron los cambios de pH inducidos por glucosa en suspensiones de la cepa salvaje de *S. cerevisiae* (BY4741). Se hicieron 3 repeticiones con distintas cantidades de levadura (42, 21 y 10,5 mg) y como se aprecia en la figura 7, la velocidad de bajada de pH aumenta con la cantidad de levadura.

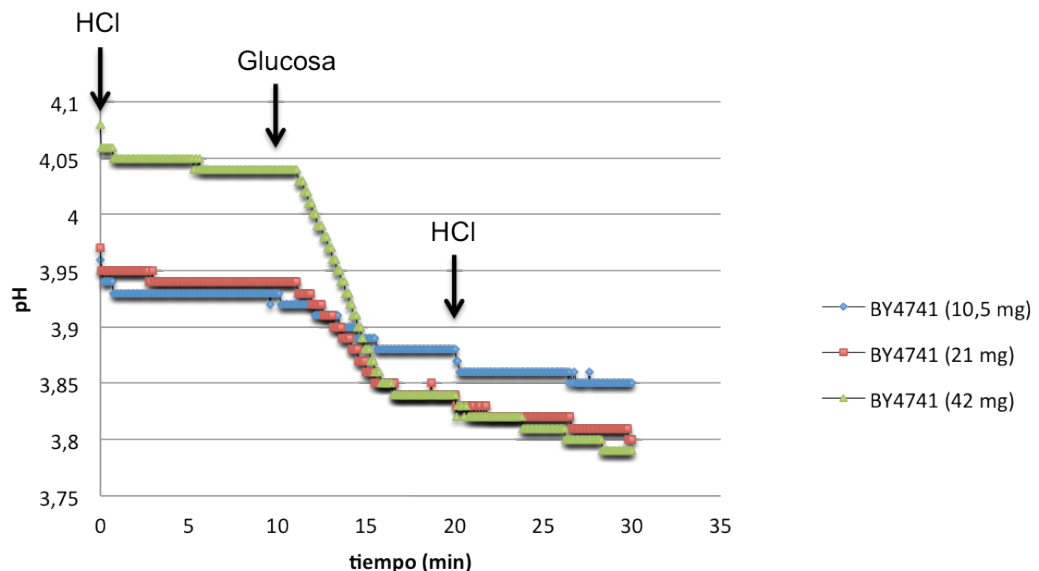


Figura 7. Cambios de pH inducidos por glucosa en suspensiones con distintas cantidades de la cepa de *S. cerevisiae* BY4741.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. Las cepas se suspendieron en 2 ml de tampón (100 mM KCl y 10 mM glicilglicina, ajustado a pH 4 con HCl) y el pH se midió como se describe en materiales y métodos. A los tiempos indicados en materiales y métodos se añadió glucosa (50 µmol) y pulsos de calibración de 100 nmol de HCl.

Como se representa en la figura 8, la velocidad de bombeo de protones (nmoles H^+ /min) es directamente proporcional a la cantidad de levadura.

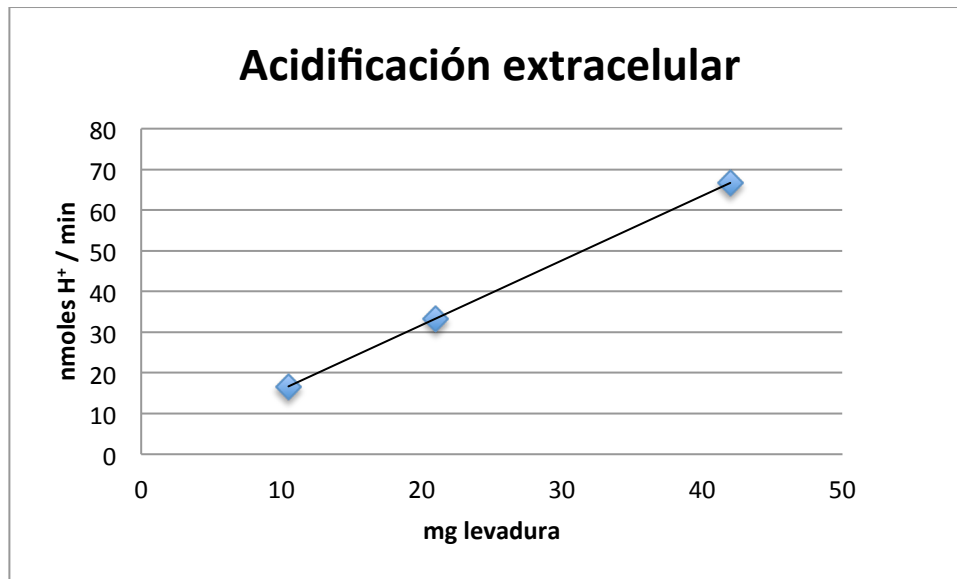


Figura 8. Velocidad de bombeo de protones en suspensiones con distintas cantidades de la cepa de *S. cerevisiae* BY4741.

4.1.1. Mutantes con pérdida de función.

Se midió la actividad de la H^+ -ATPasa *in vitro* en membranas aisladas de mutantes nulos de *SIT4* (*sit4Δ*), *SSD1* (*ssd1Δ*) y *TCO89* (*tco89Δ*) y en la cepa silvestre (BY4741), que se empleó como control. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos, cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas y las barras de error indican el error estándar.

Al comparar los mutantes con la cepa control se observa un descenso en la actividad enzimática del 30% en el mutante de *SIT4* (*sit4Δ*). El análisis de los resultados a través de la prueba estadística t-Student indica, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$), que hay diferencias significativas en la actividad de Pma1 del mutante *sit4Δ* con respecto a la cepa control BY4741. Tomando la actividad de BY4741 como 100%, la actividad del mutante *sit4Δ* es 70%

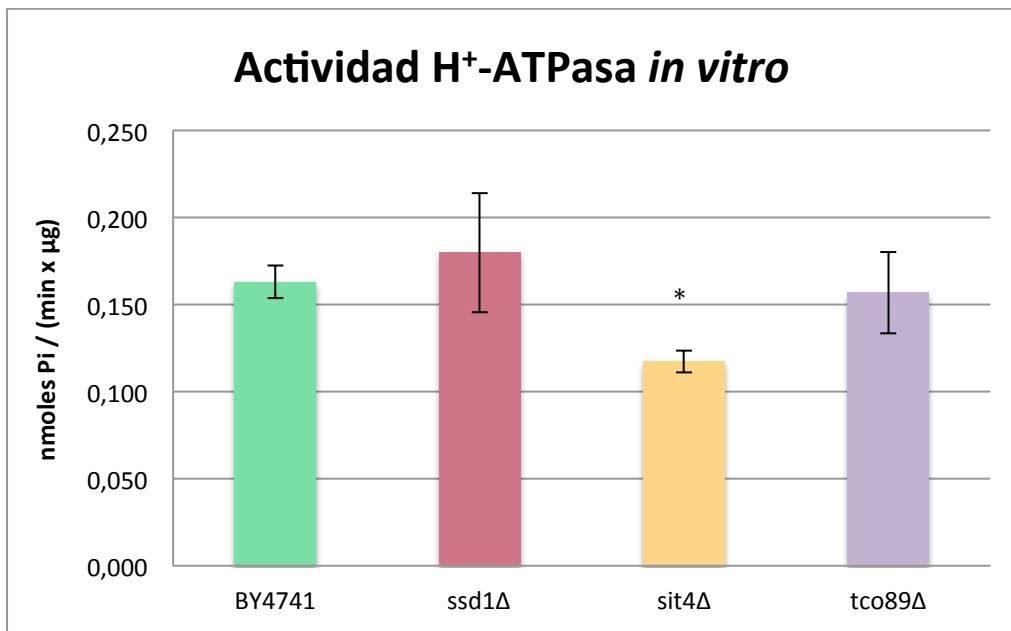


Figura 9. Actividad enzimática *in vitro* de las cepas de *S. cerevisiae* *ssd1Δ*, *sit4Δ* y *tco89Δ*, comparadas con su control BY4741.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. El proceso de obtención de la membrana plasmática y de la medida de la actividad H⁺-ATPasa se realizó según el procedimiento descrito en materiales y métodos. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas y las barras de error corresponden al error estándar. La cepa que tiene diferencias significativas en la actividad con respecto al genotipo salvaje se indica con un asterisco (P<0,05).

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de acidificación extracelular, en el que se midieron los cambios de pH inducidos por glucosa en suspensiones de las cepas de *S. cerevisiae* *ssd1Δ*, *sit4Δ*, *tco89Δ* y su control BY4741. Las velocidades de bombeo de protones (figura 11) de la cepa control y del mutante *ssd1Δ* son similares y mucho más elevadas que las obtenidas con las cepas *sit4Δ* (30% de BY4741) y *tco89Δ* (60% de BY4741). La prueba estadística t-Student confirma, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), que estas diferencias son significativas.

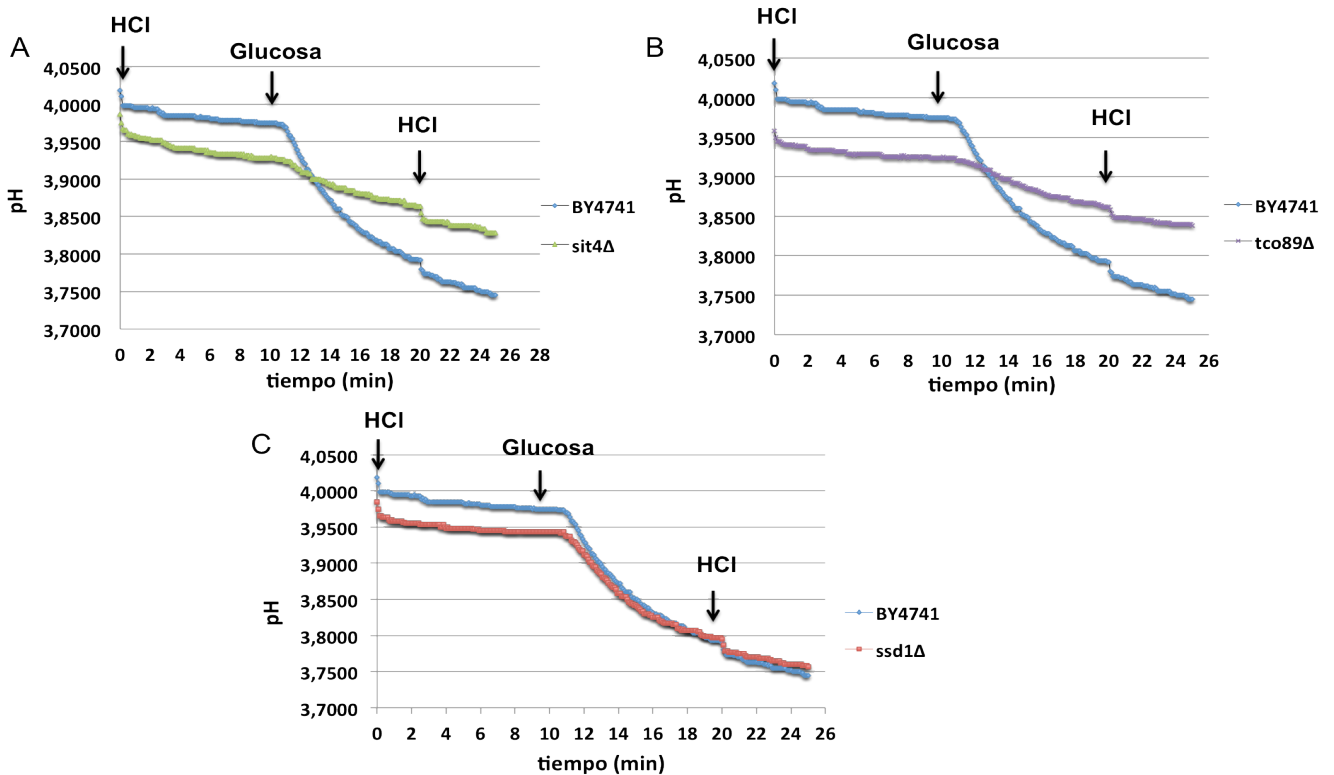


Figura 10. Cambios de pH de las suspensiones de cepas de *S. cerevisiae* inducidos por glucosa. (A) Cepa *sit4Δ* comparada con su control BY4741. (B) Cepa *tco89Δ* comparada con su control BY4741. (C) Cepa *ssd1Δ* comparada con su control BY4741.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. Las cepas se suspendieron en 2 ml de tampón (100 mM KCl y 10 mM glicilglicina, ajustado a pH 4 con HCl) y el pH se midió como se describe en materiales y métodos. A los tiempos indicados en materiales y métodos se añadió glucosa (50 μ mol) y pulsos de calibración de 100 nmol de HCl.

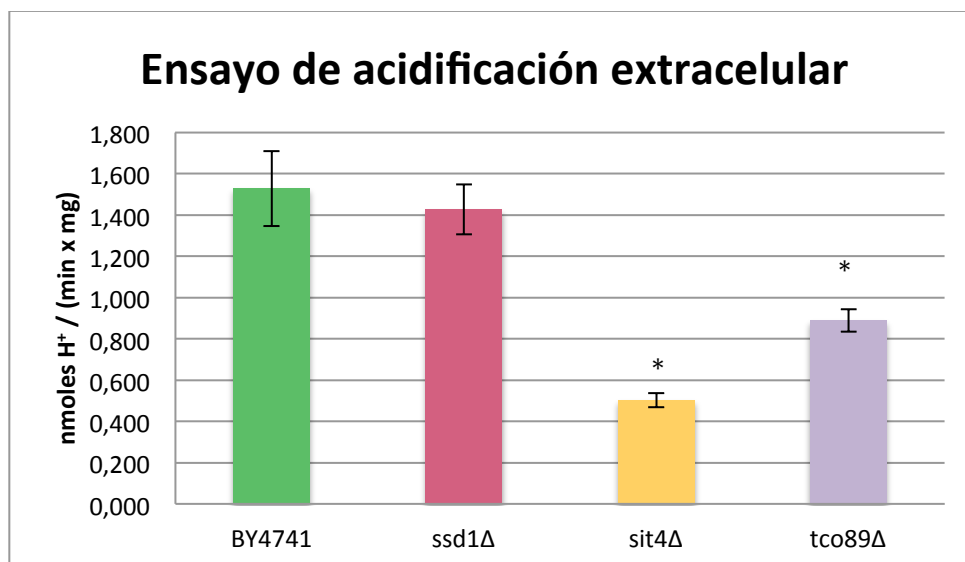


Figura 11. Velocidad de bombeo de protones de las cepas de *S. cerevisiae* *ssd1Δ*, *sit4Δ* y *tco89Δ* en comparación con su control BY4741.

Cada valor es la media de 3 repeticiones y las barras de error corresponden al error estándar. Las cepas que tienen diferencias significativas en la actividad con respecto al genotipo salvaje se indican con un asterisco ($P < 0,05$).

4.1.2. Mutantes con ganancia de función.

Se analizó un mutante de ganancia de función de *SSD1*. Para ello, se había transformado la cepa RS-132 de *S. cerevisiae* (que tiene un alelo de *SSD1* no funcional, *ssd1-d*) con el plásmido pRS-987 conteniendo un inserto del gen *SSD1-v*. Como control se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido vacío. Los resultados obtenidos de la actividad de Pma1 *in vitro* y del ensayo de acidificación extracelular se muestran en las figuras 12 y 13. El análisis estadístico nos indica que no existen diferencias significativas entre ambas cepas. Estos resultados apoyan los obtenidos en el fondo genético BY4741 comparando la cepa silvestre con la de pérdida de función (*ssd1Δ*) (véase figura 11).

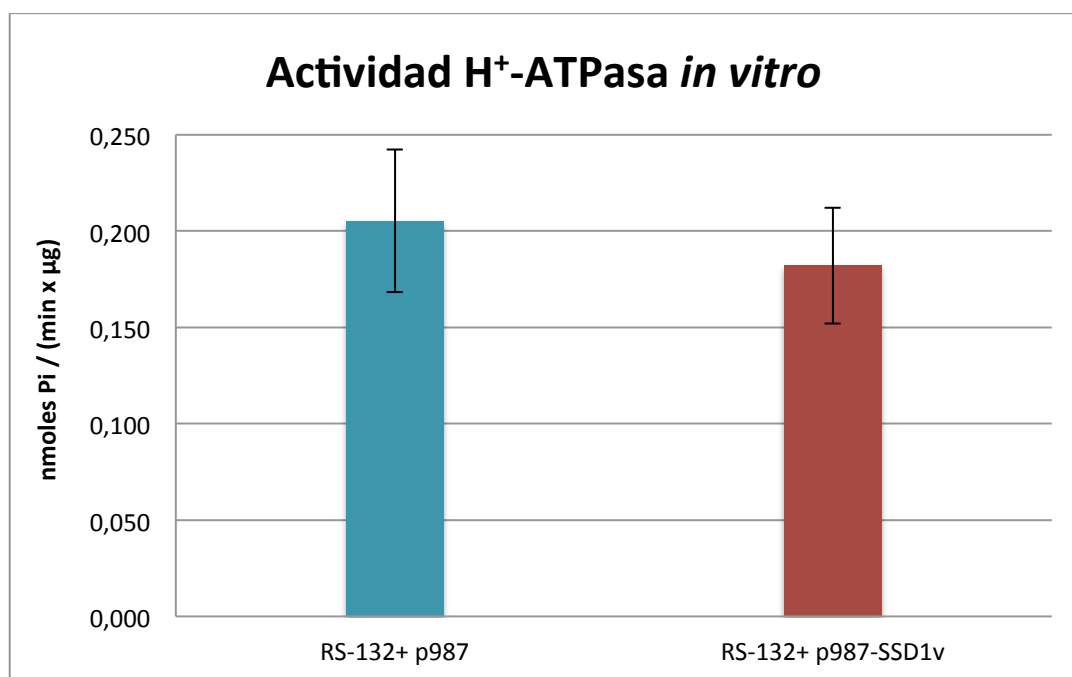


Figura 12. Actividad enzimática *in vitro* de la cepa de *S. cerevisiae* RS-132+p987-SSD1v comparada con su control RS-132+p987.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. El proceso de obtención de la membrana plasmática y de la medida de la actividad H⁺-ATPasa se realizó según el proceso descrito en materiales y métodos. Cada valor es la media de 3 repeticiones y las barras de error corresponden al error estándar.

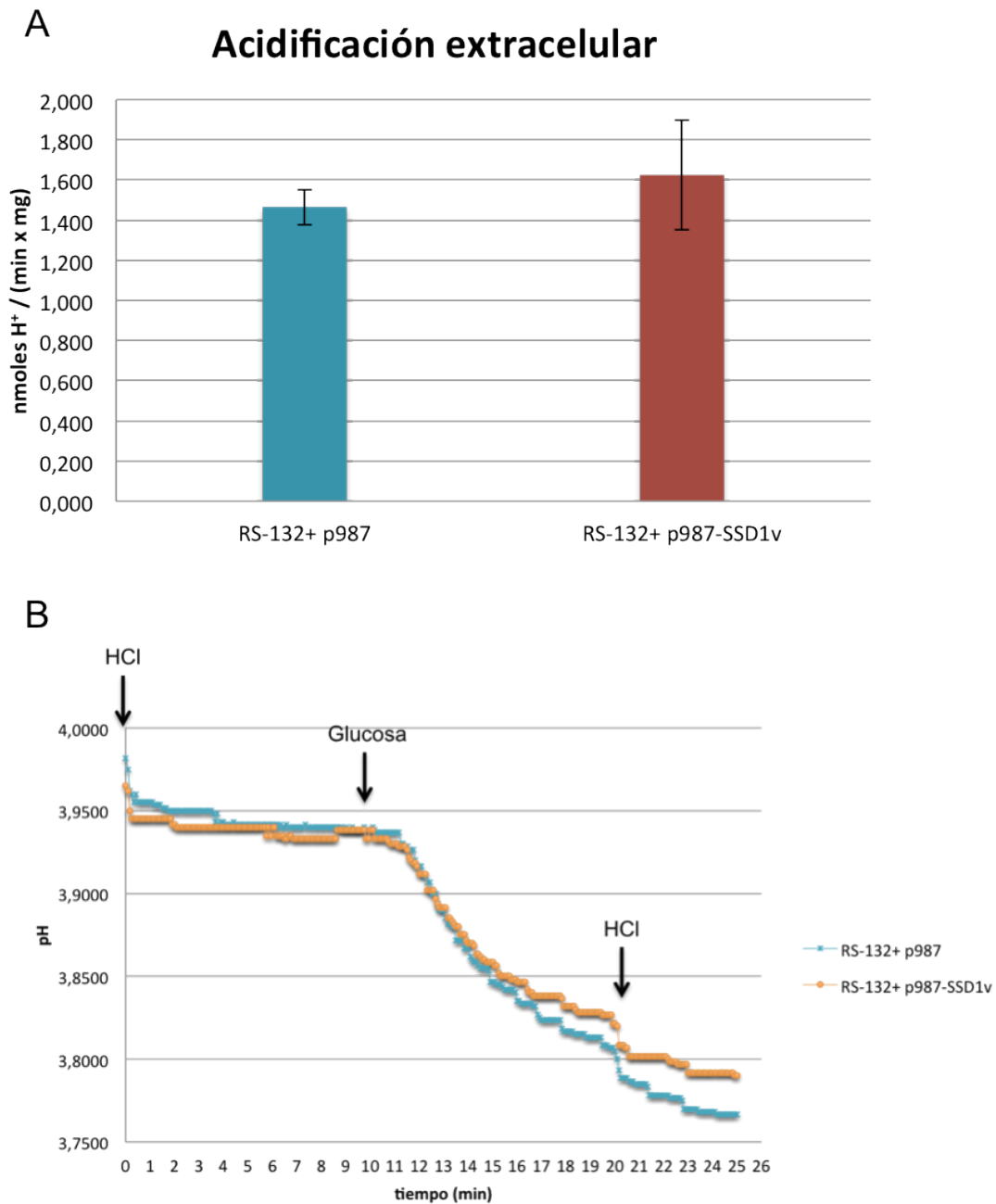


Figura 13. Ensayo de acidificación extracelular de la cepa de *S. cerevisiae* RS-132+p987-SSD1v comparada con su control RS-132+p987. (A) Velocidad de bombeo de protones. (B) Cambios de pH de las suspensiones de *S. cerevisiae* inducidos por glucosa.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. Las cepas se suspendieron en 2 ml de tampón (100 mM KCl y 10 mM glicilglicina, ajustado a pH 4 con HCl) y el pH se midió como se describe en materiales y métodos. A los tiempos indicados en materiales y métodos se añadió glucosa (50 μ mol) y pulsos de calibración de 100 nmol de HCl.

4.2. Regulación de la actividad enzimática de Pma1 por parte de la kinasa TOR.

Se estudió el efecto de la proteína TOR, una de las kinasas más importantes de las células eucariotas, en la actividad de Pma1.

4.2.1. Efecto de la rapamicina en el crecimiento de las cepas.

Como se explica en la introducción, la rapamicina es un macrólido que inhibe la acción de TORC1. Por este motivo, se estudió el efecto de este antibiótico en la actividad de Pma1 de la cepa salvaje (BY4741) y del mutante *fpr1Δ* de *S. cerevisiae*. Este mutante carece del gen *FPR1*, el cual codifica la proteína FKBP12 que es el receptor de rapamicina, por lo que es resistente a esta sustancia. También se analizó el efecto de la rapamicina en la cepa *sit4Δ*. Para confirmar el fenotipo de las cepas, se determinó la concentración de rapamicina y el tiempo de tratamiento necesario para una buena inhibición. Se analizó el crecimiento midiendo la absorbancia de los cultivos a distintos tiempos. En la curva de crecimiento de la cepa BY4741 (figura 14) se ve como a partir de las 5 h hay una notable diferencia de crecimiento entre las células tratadas y las células sin tratar con rapamicina, pero no se observan diferencias de crecimiento de las células con las dos concentraciones de rapamicina ensayadas.

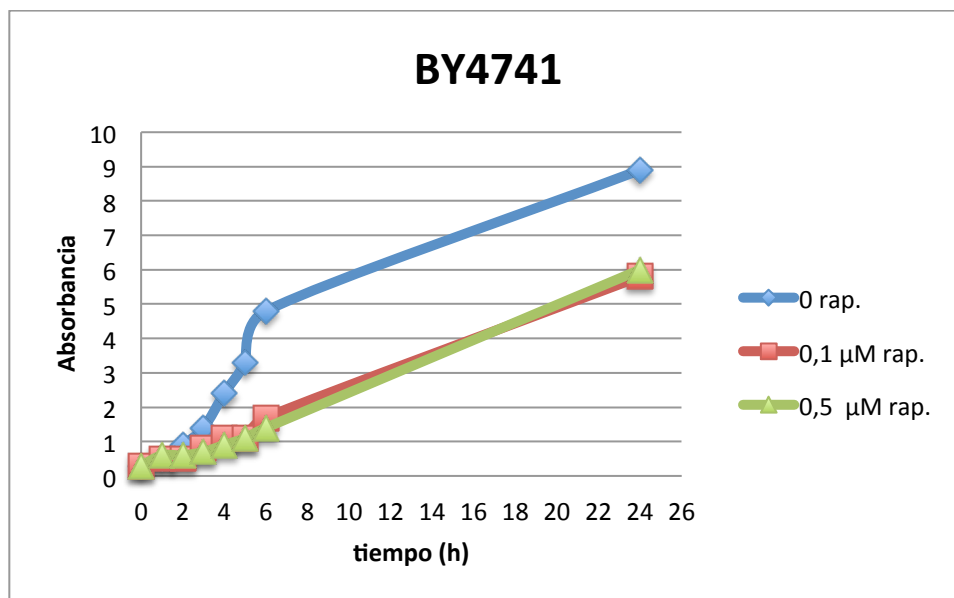


Figura 14. Crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* BY4741 a distintas concentraciones de rapamicina.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD de 0,3 (tiempo 0). Se separaron 3 muestras de 20 ml. Se añadió rapamicina (0 μM, 0,1 μM y 0,5 μM). Se incubaron en las condiciones mencionadas anteriormente y se midió la absorbancia a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h). La línea entre 6 y 24 h no refleja el crecimiento real entre ambos tiempos.

La curva de crecimiento obtenida con la cepa *fpr1Δ* se muestra en la figura 15. Se puede observar que no existen diferencias de crecimiento en la cepa incubada con y sin rapamicina.

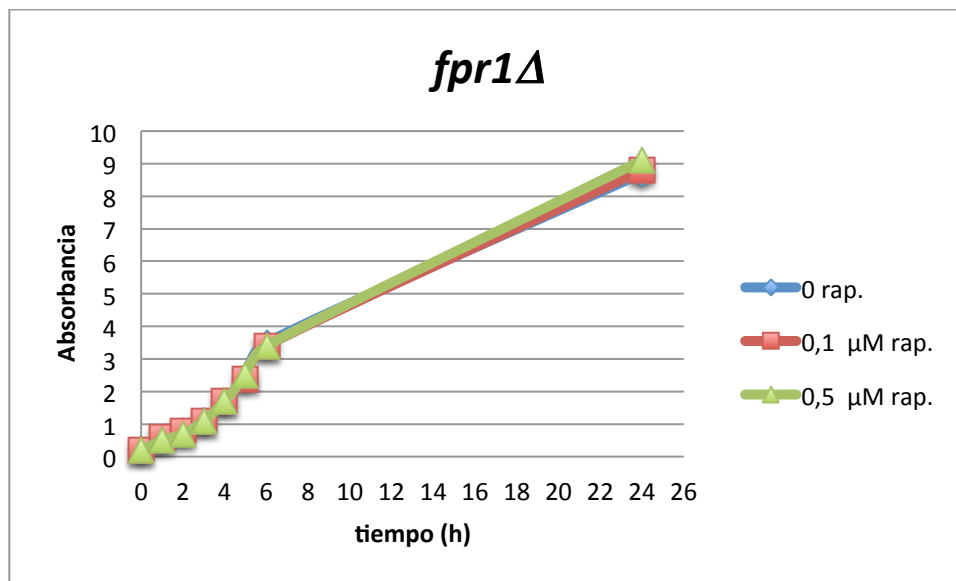


Figura 15. Crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae fpr1Δ* a distintas concentraciones de rapamicina.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD de 0,3 (tiempo 0). Se separaron 3 muestras de 20 ml. Se añadió rapamicina (0 μM, 0,1 μM y 0,5 μM). Se incubaron en las condiciones mencionadas anteriormente y se midió la absorbancia a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h). La línea entre 6 y 24 h no refleja el crecimiento real entre ambos tiempos.

Por último, en la curva de crecimiento de la cepa *sit4Δ* (figura 16) se observa una diferencia de crecimiento entre las células tratadas y las células sin tratar con rapamicina.

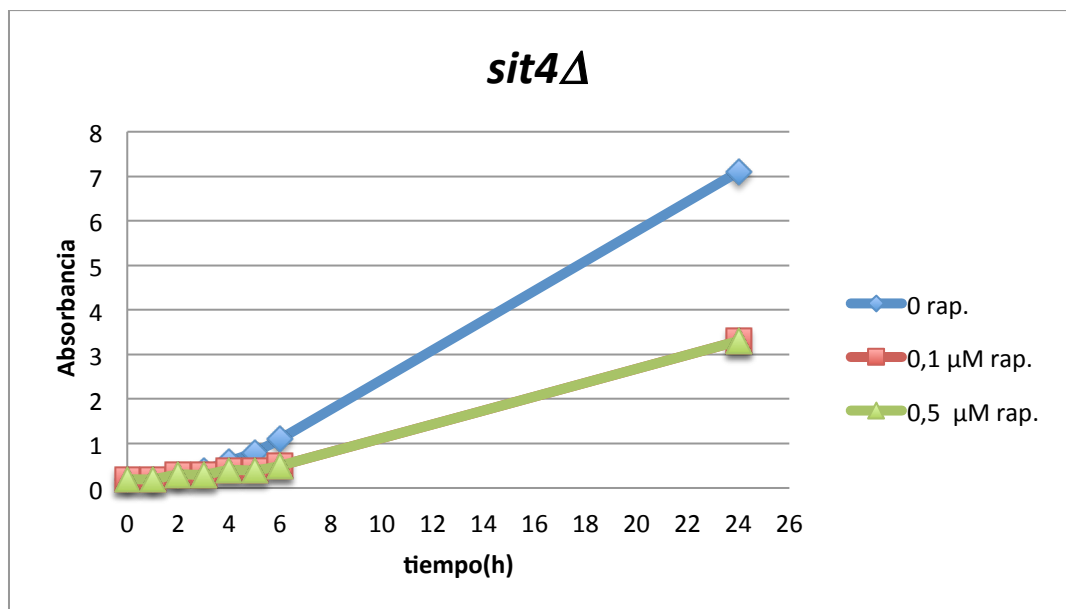


Figura 16. Crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae sit4Δ* a distintas concentraciones de rapamicina.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD de 0,3 (tiempo 0). Se separaron 3 muestras de 20 ml. Se añadió rapamicina (0 μM, 0,1 μM y 0,5 μM). Se incubaron en las condiciones mencionadas anteriormente y se midió la absorbancia a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h). La línea entre 6 y 24 h no refleja el crecimiento real entre ambos tiempos.

4.2.2. Efecto de la rapamicina en la actividad enzimática de Pma1.

Se analizó la actividad de Pma1 *in vitro* después de incubar las cepas BY4741, *fpr1Δ* y *sit4Δ* de *S. cerevisiae* con rapamicina durante 5 h. Se puede apreciar un descenso estadísticamente significativo (nivel de confianza 95%), de aproximadamente un 44%, en la actividad de Pma1 de la cepa BY4741 tratada con rapamicina con respecto a la que estaba sin tratar. Por el contrario, en las cepas *fpr1Δ* y *sit4Δ* no hay diferencias entre los cultivos incubados con y sin rapamicina (Figuras 17 y 18).

Actividad H⁺-ATPasa *in vitro*

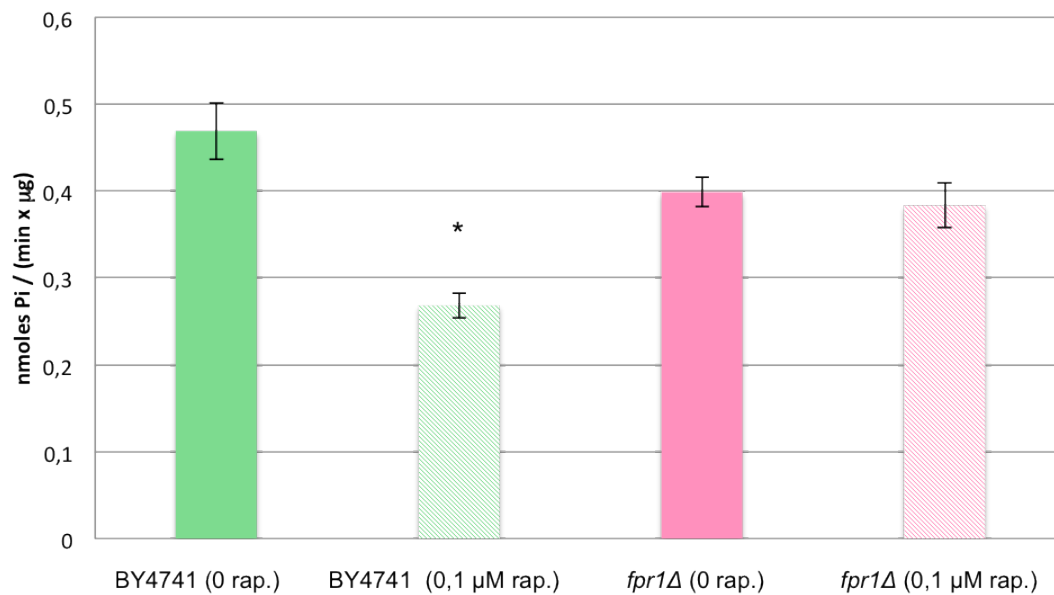


Figura 17. Actividad enzimática *in vitro* de las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 y *fpr1Δ* tratadas y sin tratar con rapamicina.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD de 0,3 (tiempo 0). Se separaron 2 muestras y se añadió rapamicina (0 μM y 0,1 μM). Se incubaron 5 h, se prepararon las membranas y se midió la actividad H⁺-ATPasa según el proceso descrito en materiales y métodos. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas y las barras de error corresponden al error estándar. Se comparó la actividad de cada cepa tratada con y sin rapamicina, si hay diferencias significativas se indica con un asterisco (P<0,05).

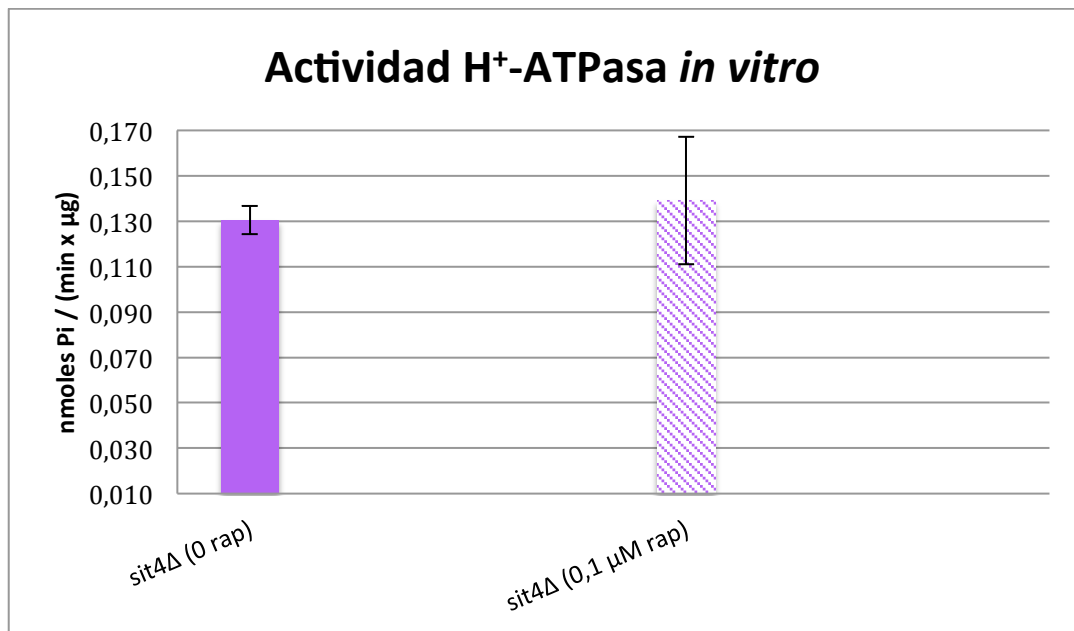


Figura 18. Actividad enzimática *in vitro* de la cepa de *S. cerevisiae sit4Δ* tratada y sin tratar con rapamicina.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD de 0,3 (tiempo 0). Se separaron 2 muestras y se añadió rapamicina (0 μM y 0,1 μM). Se incubaron 5 h, se prepararon las membranas y se midió la actividad H⁺-ATPasa según el proceso descrito en materiales y métodos. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas y las barras de error corresponden al error estándar. Se comparó la actividad de cada cepa tratada con y sin rapamicina, si hay diferencias significativas se indica con un asterisco (P<0,05).

4.2.3. Mutante termosensible de TOR.

Para confirmar que TORC1 regula la actividad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática se midió la actividad de Pma1 en las cepas de *S. cerevisiae* SH221 (*tor1Δ tor2^{ts}*) (Helliwell *et al.*, 1998), que posee un alelo termosensible para TOR2 que afecta a su función como parte del complejo TORC1 y, por tanto, se usa como un mutante condicional de TORC1; y se compara con la cepa control (SH100).

Para confirmar su fenotipo, se analizó el crecimiento de ambas cepas a temperatura no permisiva (37°C) y a temperatura ambiente (25°C). Si comparamos los resultados obtenidos entre las dos cepas se observa que la cepa control crece de manera normal a 37°C, mientras que el mutante a partir de las 5 h presenta una inhibición del crecimiento de más de tres veces con respecto a la cepa control (figura 19).

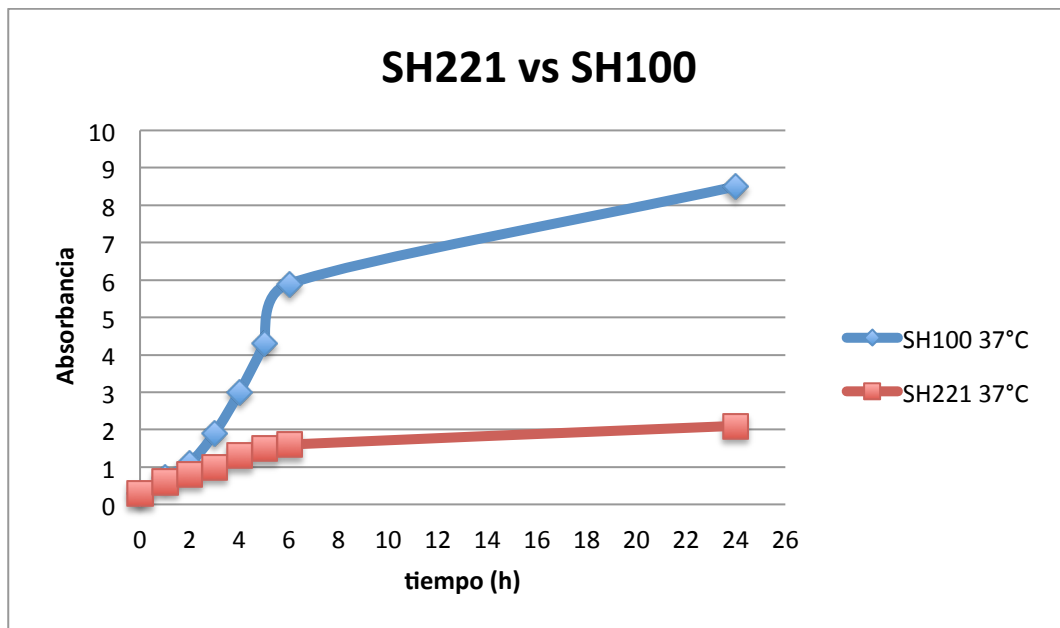


Figura 19. Crecimiento a 37°C de la cepa de *S. cerevisiae* SH221 (*tor1Δ tor2^{ts}*) y su control SH100.

Se inocularon 50 ml de medio YPDA con un cultivo en fase estacionaria, y se incubó a temperatura ambiente (25°C). Se tomó como tiempo 0 cuando alcanza una OD de 0,3. A continuación, 20 ml de los cultivos anteriores se incubaron a 37°C. El crecimiento se analizó midiendo la absorbancia a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h). La línea entre 6 y 24 h no refleja el crecimiento real entre ambos tiempos.

Por el contrario, el crecimiento de las dos cepas no se ve afectado a temperatura ambiente, que fue de 25°C (figura 20).

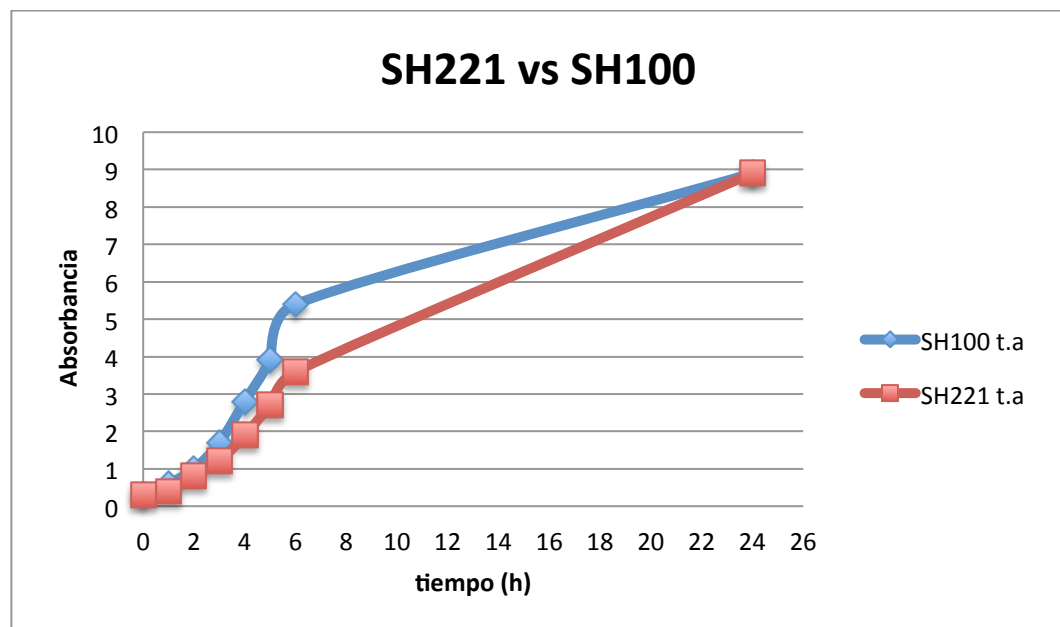


Figura 20. Crecimiento a 25°C de la cepa de *S. cerevisiae* SH221 (*tor1Δ tor2^{ts}*) y su control SH100.

Se inocularon 50 ml de medio YPDA con un cultivo en fase estacionaria, y se incubó a temperatura ambiente (25°C). Se tomó como tiempo 0 cuando alcanza una OD de 0,3. A continuación, 20 ml del cultivo anterior se incubaron a temperatura ambiente (25°C). El crecimiento se analizó midiendo la absorbancia a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h). La línea entre 6 y 24 h no refleja el crecimiento real entre ambos tiempos.

Es a partir de las 5 h y 37°C cuando se produce una clara diferencia entre el crecimiento de las cepas, por lo que este intervalo de tiempo se utiliza para el ensayo de la actividad *in vitro* de Pma1.

Como se ilustra en la figura 21, hay una disminución de un 46% en la actividad *in vitro* de la H⁺-ATPasa en el mutante termosensible SH221 al crecer a 37°C, en comparación con el mutante incubado a temperatura ambiente y con la cepa salvaje SH100 crecida a ambas temperaturas. La prueba estadística t-Student demuestra que esta diferencia en los resultados es estadísticamente significativa (nivel de confianza 95%).

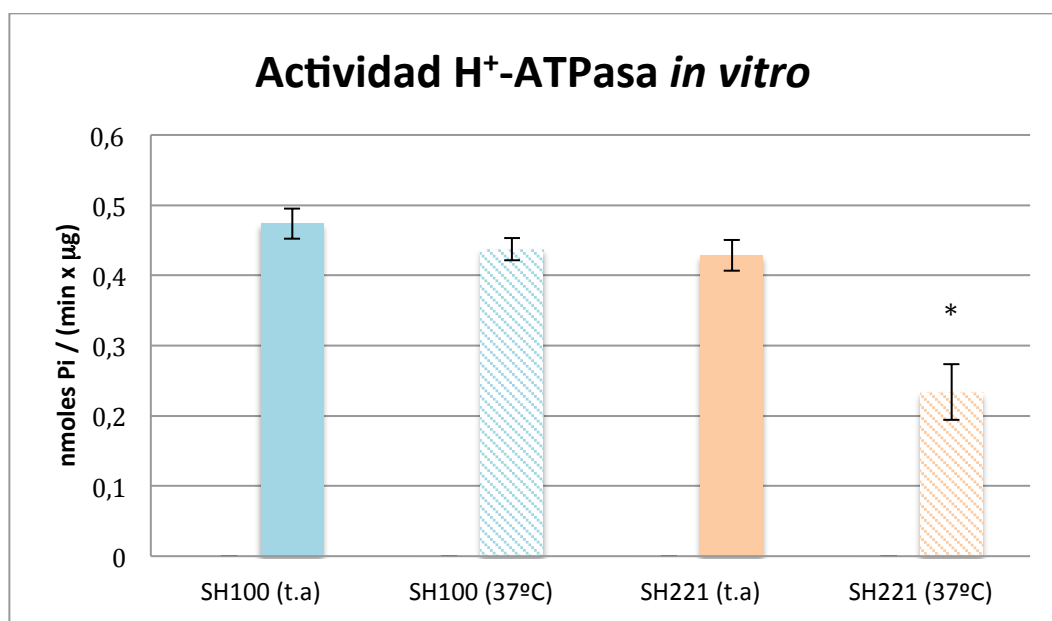


Figura 21. Actividad enzimática *in vitro* de la cepa SH221 (*tor1Δ tor2^{ts}*) y su control SH100 a 25°C y 37°C.

Se inocularon 50 ml de medio YPDA con un cultivo en fase estacionaria y se incubó a temperatura ambiente (25°C). Se tomó como tiempo 0 cuando alcanza una OD de 0,3. A continuación, 20 ml del cultivo anterior se incubaron a 37°C y otros 20 ml a temperatura ambiente (25°C). El proceso de obtención de la membrana plasmática y de la medida de la actividad H⁺-ATPasa *in vitro* se analizó a las 5 h y siguiendo el proceso descrito en materiales y métodos. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas y las barras de error corresponden al error estándar. Se comparó la actividad de cada cepa crecida a distinta temperatura, si hay diferencias significativas se indica con un asterisco (P<0,05).

4.3. Análisis por *Western Blot* de proteínas de membrana.

4.3.1. Cantidad total de Pma1.

Para determinar si la disminución de la actividad de Pma1 observada en el mutante *sit4Δ* y en la cepa control tratada con rapamicina se debe a una disminución en la cantidad de Pma1 o a una disminución de actividad de la enzima se ha determinado la cantidad de Pma1 presente en las membranas de estas cepas mediante *Western blot* con un anticuerpo (nº 838) contra Pma1.

Observando los resultados obtenidos (figura 22), no se aprecian diferencias importantes en cuanto a la cantidad de Pma1 entre las células tratadas con rapamicina con respecto a las que estaban sin tratar. Tampoco entre la cepa *sit4Δ* y su control.

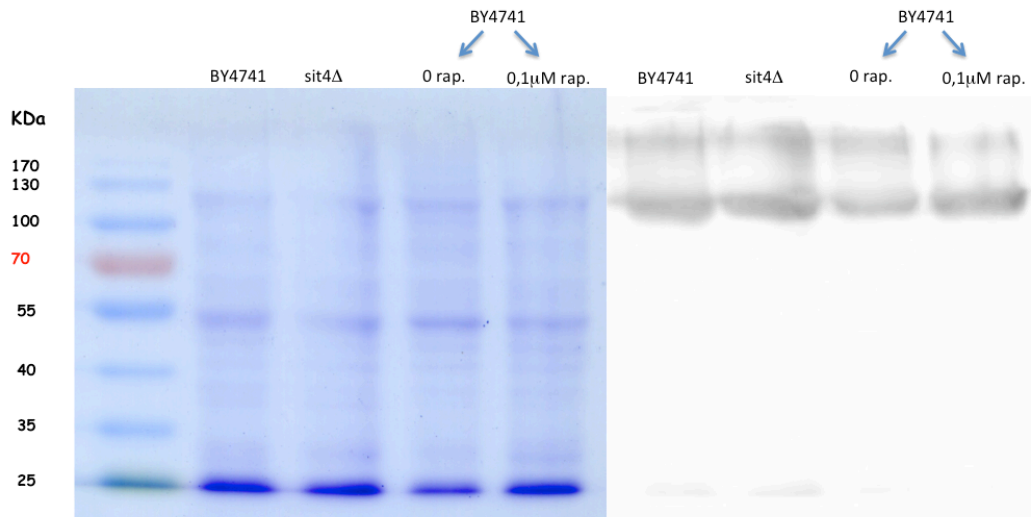


Figura 22. Resultados *Western blot* con el anticuerpo nº 838. A la izquierda se muestra la membrana teñida con Direct blue. A la derecha, la membrana incubada con el anticuerpo nº 838.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. Para la obtención de la membrana plasmática se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos. Las muestras se precipitaron con TCA como se menciona en materiales y métodos.

4.3.2. Nivel de fosforilación de Pma1.

Como se dispone de un anticuerpo específico para la H⁺-ATPasa fosforilada en Ser-911 y Thr-912 (α -pSpT), se investigaron los cambios en la fosforilación de Pma1 en estos aminoácidos en el mutante *sit4Δ* y en la cepa BY4741 tratada con rapamicina mediante *Western blot*. Al tener menos actividad Pma1, se esperaba que dicha fosforilación activadora fuera menor en *sit4Δ* y en BY4741 tratada con rapamicina.

Sorprendentemente los resultados obtenidos (figura 23) indican que el nivel de fosforilación de los aminoácidos Ser-911 y Thr-912 del extremo C-terminal es algo mayor tanto en la cepa *sit4Δ* como en la cepa silvestre (BY4741) tratada con rapamicina, con respecto a sus respectivos controles.

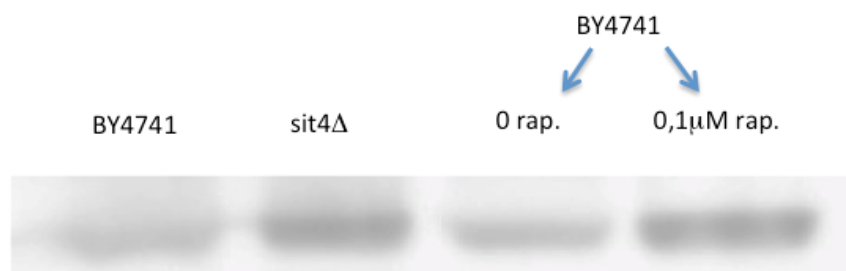


Figura 23. Resultados *Western blot* con el anticuerpo α -pSpT.

Cultivos en fase estacionaria se inocularon en YPDA fresco, se incubaron a 28°C durante toda la noche y se recogieron en fase exponencial con una OD entre 2 y 4. Para la obtención de la membrana plasmática se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos. Las muestras se precipitaron con TCA como se menciona en materiales y métodos.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Sit4 pero no Ssd1 regula la actividad de Pma1.

El nivel de fosforilación de proteínas importantes como Pma1 puede depender no sólo de la actividad de las proteínas kinasas, sino también de las actividades relativas de las kinasas y fosfatasa que actúan sobre el dominio regulador de la enzima. La proteína kinasa TORC1 es un firme candidato a regular Pma1 porque activa el crecimiento y proliferación celular al igual que Pma1. TORC1 actúa a través de dos rutas de señalización: una está mediada por la proteína fosfatasa Sit4 y otra por la proteína kinasa Sch9. Esta última no parece regular Pma1 (Mazón *et al.*, 2015). Se eligió la proteína fosfatasa Sit4 porque regula la fase G1 del ciclo celular, al igual que Pma1, y porque el mutante es sensible a acidificación intracelular. La función esencial de Sit4 en el crecimiento celular es redundante con la proteína de unión a RNA Ssd1, por lo que una de las dos debe ser funcional para que la levadura pueda crecer.

Para comprobar el papel de estas proteínas en la regulación de Pma1, se estudió la actividad de esta enzima en mutantes de pérdida de función de Sit4 y Ssd1. Los mutantes *sit4Δ* y *ssd1Δ* tienen defecto de crecimiento en medio normal y en la cepa *sit4Δ* este defecto es bastante mayor. Además, el mutante *ssd1Δ* tiene un defecto en el crecimiento en presencia de ácidos débiles (acético, sórbico) que inducen acidificación intracelular (datos de Consuelo Montesinos y Ramón Serrano). Por tanto, la proteína Ssd1 confiere tolerancia a ácidos débiles. Como cepa alternativa se plantea que la cepa de laboratorio RS-132 es equivalente al mutante en *SSD1* y la cepa transformada con el gen *SSD1* proveniente de BY4741 es equivalente al control silvestre. Pues bien, tanto en esta pareja de cepas como en el mutante *ssd1Δ* derivado de BY4741, los resultados indican que *SSD1* no tiene efecto en la actividad H⁺-ATPasa en membranas ni en la salida de protones en células enteras. De este modo, el mecanismo de tolerancia a acidificación intracelular producido por Ssd1 no se debe a una mayor activación de Pma1.

Sit4 es una fosfatasa importante en levaduras. Como el mutante nulo es viable, se utilizó para investigar el efecto de esta fosfatasa sobre la actividad de Pma1. El mutante muestra una disminución de la actividad de Pma1 *in vitro*. Además, el bombeo de H⁺ en esta cepa es también menor en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados indican que Sit4 es un regulador positivo de la actividad de Pma1. Cabe destacar, que mientras el descenso en la actividad *in vitro* fue del 30%, en el bombeo de H⁺ fue mayor, en concreto del 70%. Esto puede ser debido a que la actividad de Pma1 medida en función de la salida de H⁺ no solo depende de la actividad de Pma1, sino también de la entrada de K⁺ a través del canal Trk1. La acción de este sistema determina el potencial eléctrico de membrana, ya que contribuye a relajar el gradiente eléctrico provocado por el funcionamiento de Pma1 (Madrid *et al.*, 1998). Por tanto, es posible que la toma de K⁺ en este mutante esté afectada y, en consecuencia, decaiga el bombeo de H⁺ para evitar la hiperpolarización de la membrana plasmática. Esta hipótesis se está comprobando en el laboratorio de Ramón Serrano a través de un ensayo de toma de Rb⁺, un análogo del K⁺, por parte de las células y los resultados muestran que en el mutante nulo de *SIT4* la entrada de K⁺ es menor (datos sin publicar).

La doble fosforilación de la Ser-911 y Thr-912 es un evento regulador importante que aumenta la actividad de Pma1. El nivel de fosforilación de la enzima se estudió empleando anticuerpos contra esta doble fosforilación y sorprendentemente fue mayor en el mutante *sit4Δ* que en la cepa control, mientras que en la cantidad total de H⁺-ATPasa de membrana no se observaron diferencias. Por tanto, la menor actividad de Pma1 en el mutante *sit4Δ* debe

estar relacionada con otro sitio regulador. Estrada *et al.* (1996) descubrieron que la caseína quinasa-I fosforila la Ser-507 de Pma1, inhibiendo su actividad. Así, una interpretación de nuestros resultados podría ser que Sit4 desfosforila la Ser-507 de Pma1, provocando la activación de la enzima. La mayor fosforilación de Ser-911 y Thr-912 en el mutante *sit4Δ* podría resultar de un mecanismo para compensar la mayor fosforilación inhibitoria de la Ser-507.

La delección del gen *SIT4* anula el efecto de la rapamicina sobre Pma1 (figura 18) a pesar de que este compuesto inhibe el crecimiento de la levadura *sit4Δ* (figura 16). Esto sugiere que el efecto de TORC1 sobre Pma1 está probablemente mediado por Sit4 y que la inhibición del crecimiento por rapamicina no se puede explicar solamente por la inhibición de Pma1.

5.2. TORC1 regula la actividad de Pma1.

Tanto Pma1 como la quinasa esencial TOR están implicadas en el crecimiento celular. Además, Pma1 se activa en presencia de nutrientes y la quinasa TOR media el control temporal del crecimiento celular (Wullschleger *et al.*, 2006), regulando la actividad de esta enzima en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. De este modo, es lógico pensar que existe una relación entre ambas proteínas.

La participación de la quinasa TORC1 en la regulación de Pma1 se ha investigado de tres formas distintas. Por un lado, mediante el tratamiento de las cepas con rapamicina, una droga que inhibe TORC1 y provoca la entrada de las células en la fase G_0 (Barbet *et al.*, 1996). Por otro lado, aumentando la temperatura en un mutante termosensible de TORC1. Por último, se utilizó un mutante nulo de la subunidad Tco89 de TORC1.

Como se observa en la figura 14, el tratamiento con rapamicina inhibe el crecimiento de las células de levadura de la cepa salvaje (BY4741). Esto se debe a que TORC1 es fundamental para el crecimiento celular (Wullschleger *et al.*, 2006). Además, se produjo un descenso del 44% en la actividad de Pma1 después de la incubación con rapamicina (figura 17). Estos resultados se confirmaron en la cepa SH221 (*tor1Δ tor2^{ts}*), que posee un alelo termosensible para TORC1. El crecimiento y actividad de Pma1 son normales a temperatura ambiente. Sin embargo, a 37°C se produce un notable descenso en ambos parámetros. En este caso el descenso en la actividad enzimática es alrededor del 46% (figura 21). Así, se puede descartar un error experimental en los resultados o que el descenso observado en la actividad de Pma1 sea debido a un efecto de la rapamicina distinto de su función como inhibidor de TORC1.

Con respecto al mutante nulo de *TCO89*, la actividad de Pma1 *in vitro* no se ve afectada. Sin embargo, al medir la actividad de la enzima en base a la acidificación extracelular generada por la salida de H^+ , se observa un descenso significativo (de aproximadamente el 40%). Así, no se puede concluir que la actividad de Pma1 en este mutante sea menor; ya que los resultados del ensayo de acidificación pueden ser debidos a que, al carecer el complejo TORC1 de la subunidad tco89, se produce un defecto en la toma de K^+ por parte de la célula. Como consecuencia, disminuye la velocidad de bombeo de H^+ para evitar la hiperpolarización de la membrana. Esta hipótesis se está comprobando en el laboratorio de Ramón Serrano a través de un ensayo de toma de Rb^+ y los resultados muestran que en el mutante nulo de *TCO89* la entrada de K^+ es menor (datos sin publicar). Estos datos concuerdan con el hecho de que la cepa *tco89Δ* es sensible a acidificación intracelular (Datos de Consuelo Montesinos y Ramón Serrano), ya que al disminuir el bombeo de H^+ la célula no puede hacer frente al elevado pH del interior celular.

Por otra parte, los resultados obtenidos confirman que la función inhibidora de la rapamicina depende de la formación de un complejo del fármaco con el receptor FKBP12 (Loewith *et al.*, 2002), ya que en el mutante nulo de *FPR1* (gen que codifica la proteína FKBP12) no se observan diferencias en el crecimiento ni en la actividad de Pma1 de las células tratadas con rapamicina con respecto a las que estaban sin tratar.

De este modo, los resultados obtenidos indican que la kinasa TOR regula la actividad de Pma1. El descenso en la actividad enzimática de las células tratadas con rapamicina, podría ser debido a una disminución en la cantidad de proteína. Como describen Barbet *et al.* (1996), la pérdida de función de TOR produce una elevada caída en la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la iniciación de la traducción. Para estudiar esta posibilidad, se mide la cantidad de enzima después del tratamiento con rapamicina con anticuerpos contra la H⁺-ATPasa de la membrana total. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias importantes en la cantidad de proteína, por lo que el descenso en la actividad enzimática tiene que ser debido a una menor activación de Pma1 debido a la inactivación de TORC1. El nivel de fosforilación del enzima empleando anticuerpos contra la doble fosforilación de la Ser-911 y Thr-912 fue mayor que en la cepa control. Por tanto, la activación de Pma1 por parte de TORC1 no está relacionada con esta doble fosforilación. En este trabajo proponemos la hipótesis de que TORC1 activa Pma1 vía la fosfatasa Sit4, que como se explicó anteriormente se encargaría de desfosforilar la Ser-507 de Pma1, aumentando así la actividad enzimática. Este modelo se plasma en la figura 24.

Los resultados expuestos en este trabajo muestran que Sit4 aumenta la actividad de Pma1 y la rapamicina la disminuye. Sabiendo que la inactivación de TORC1 resulta en la disociación de Tap42 de las fosfatasa (Di Como y Arndt, 1996), probablemente Sit4 necesita la unión con Tap42 en su ruta para activar Pma1. Nuestra conclusión de que tanto TORC1 como SIT4 se requieren para la activación de Pma1 está de acuerdo con el hallazgo de que SIT4 actúa aguas abajo de TORC1 para muchas funciones fisiológicas importantes, incluyendo el control del crecimiento en respuesta a los nutrientes (Rhode *et al.*, 2004), una función a la que también contribuye Pma1, activada por glucosa (Serrano, 1983; Portillo y Serrano 1989). Además, la actividad de Pma1 en el mutante *sit4Δ* no cambió después del tratamiento de esta cepa con rapamicina. Esto apoya nuestra hipótesis de que TORC1 activa Pma1 por medio Sit4, ya que al carecer las células del gen *SIT4* por mucho que inactivemos TORC1, la actividad de Pma1 no va a disminuir.

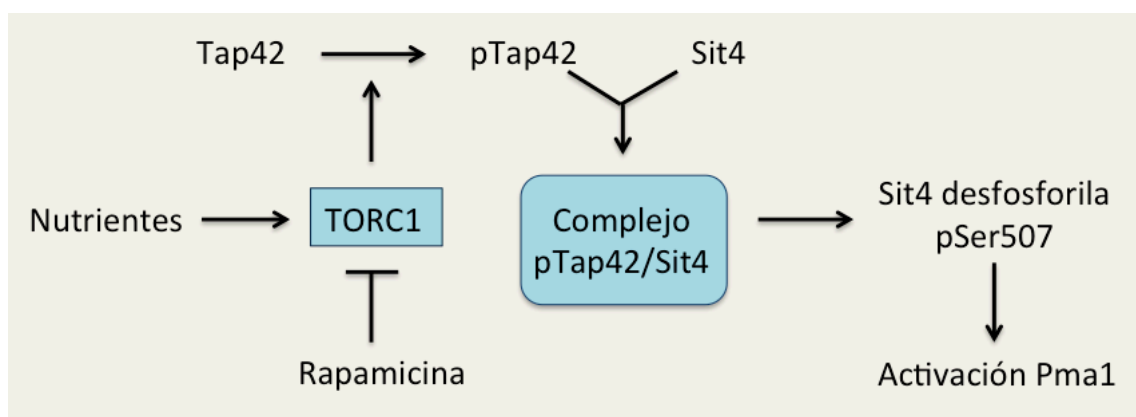


Figura 24. Modelo propuesto para la activación de Pma1 por parte de TORC1 y Sit4. TORC1 fosforila a Tap42, que se une a Sit4 (Complejo pTap42/Sit4). Sit4 desfosforila la Ser-507 del dominio C-terminal, lo que produce la activación de Pma1.

6. CONCLUSIONES.

1. La delección del gen *SIT4* en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* produce un descenso en la actividad de Pma1, tanto medida por cuantificación de la hidrólisis de ATP como por el bombeo de H⁺. Por tanto, la proteína fosfatasa Sit4 es un regulador positivo de la actividad de Pma1.
2. La inhibición de la proteína kinasa TORC1 con rapamicina conlleva una disminución de la actividad de Pma1. Por tanto, TORC1 regula positivamente la actividad de esta enzima.
3. TORC1 requiere Sit4 para la activación de Pma1, lo que está de acuerdo con que Sit4 actúa aguas abajo de TORC1 en su ruta de señalización.
4. La cantidad de Pma1 no se afecta ni por Sit4 ni por TORC1 por lo que la regulación no se debe a cambios en la cantidad de Pma1 sino en su actividad
5. El sitio conocido de activación de Pma1 por fosforilación, Ser-911 Thr-912, no participa en la activación de la enzima por TORC1 y Sit4.

7. BIBLIOGRAFÍA.

ARNDT, K.T.; STYLES, C.A. & FINK, G.R. (1989). A Suppressor of a HIS4 Transcriptional Defect Encodes a Protein with Homology to the Catalytic Subunit of Protein Phosphatases. *Cell*, 56: 527-537.

AXELEN, K. & PALMGREN, M. (1998). Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. *J. Mol. Evol.*, 46(1): 84-101.

BARBET, N.C.; SCHNEIDER, U.; HELLIWELL, S.B.; STANSFIELD, I.; TUIE, M.F. & HALL, M.N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 7(1): 25-42.

BENITO, B., PORTILLO, F. & LAGUNAS, R. (1992). In vivo activation of the plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. Identification of the regulatory domain that controls activation. *FEBS Lett.*, 300: 271-274.

BERG, J.; TYMOCZKO, J. & STRYER, L. (2002). *Biochemistry*, 5th ed. New York: W. H Freeman and Company.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

DE LA TORRE-RUIZ, M.; TORRES, J.; ARINO, J. & HERRERO, E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277(36): 33468-33476.

DI COMO, C.J. & ARNDT, K.T. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.*, 10: 1904-1916.

ERASO, P. & GANCEDO, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.*, 224(1): 187-192.

ERASO, P. & PORTILLO, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.*, 269: 10393-10399.

ESTRADA, E.; AGOSTINIS, P.; VANDENHEEDE, J.; GORIS, J.; MERLEVEDE, W.; FRANCOIS, J.; GOFFEAU, A. & GHISLAIN, M. (1996). Phosphorylation of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase by Casein Kinase I. *J. Biol. Chem.*, 271(50): 32064-32072.

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

GIAEVER, G.; CHU, A.M.; NI, L.; CONNELLY, C.; RILES, L.; VÉRONNEAU, S.; DOW, S.; LUCAUDANILA, A.; ANDERSON, K.; ANDRÉ, B.; ARKIN, AP.; ASTROMOFF, A.; EL-BAKKOURY, M.; BANGHAM, R.; BENITO, R.; BRACHAT, S.; CAMPANARO, S.; CURTISS, M.; DAVIS, K.; DEUTSCHBAUER, A.; ENTIAN, K.D.; FLAHERTY, P.; FOURY, F.; GARFINKEL, D.J.; GERSTEIN, M.; GOTTE, D.; GÜLDENER, U.; HEGEMANN, J.H.; HEMPEL, S.; HERMAN, Z.; JARAMILLO, D.F.; KELLY, D.E.; KELLY, S.L.; KÖTTER, P.; LABONTE, D.; LAMB, D.C.; LAN, N.; LIANG, H.; LIAO, H.; LIU, L.; LUO, C.; LUSSIER, M.; MAO, R.; MENARD, P.; OOI, S.L.; REVUELTA, J.L.; ROBERTS, C.J.; ROSE, M.; ROSS-MACDONALD, P.; SCHERENS, B.; SCHINMACK, G.; SHAFER, B.; SHOEMAKER, D.D.; SOOKHAI-MAHADEO, S.; STORMS, R.K.; STRATHERN, J.N.; VALLE, G.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.;

WANG, C.Y.; WARD, T.R.; WILHELMY, J.; WINZELER, E.A.; YANG, Y.; YEN, G.; YOUNGMAN, E.; YU, K.; BUSSEY, H.; BOEKE, J.D.; SNYDER, M.; PHILIPPSEN, P.; DAVIS, R.W.; Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418: 387-91

GUARENTE, L.; YOCUM, R.R.; GIFFORD, P. (1982). A Gal10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7410-14.

HELLIWELL, S.B.; HOWALD, I.; BARBET, N. & HALL, M.N. (1998). TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 148(1): 99–112.

JENCKS, W.P. (1989). How does a calcium pump pump calcium? *J. Biol. Chem.*, 264: 18855-18858.

JORGENSEN, P.L. (1975). Purification and characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase V. Conformational changes in the enzyme. Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochim. Biophys. Acta*, 401(3): 399–415.

KURISCHKO, C., KIM, H. K., KURAVI, V.K., PRATZKA, J., & LUCA, F.C. (2011). The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *J. Cell Biol.*, 192(4): 583–598.

LECCHI, S.; NELSON, C.J.; ALLEN, K.E.; SWANEY, D.L.; THOMPSON, K.L.; COON J.J.; SUSSMAN M.R. & SLAYMAN C.W. (2007). Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation. *J. Biol. Chem.*, 282: 35471-35481.

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

LOEWITH, R.; JACINTO, E.; WULLSCHLEGER, S.; LORBERG, A.; CRESPO, J.; BONENFANT, D.; OPPLIGER, W.; JENOE, P. & HALL, M. (2002). Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Mol. Cell*, 10(3): 457-468.

LUKE, M.M.; DELLA SETA, F.; DI COMO, C.J.; SUGIMOTO, H.; KOBAYASHI, R. & ARNDT, K.T. (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, 16(6): 2744–2755.

LUTSENKO, S. & KAPLAN, J.H. (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochem.*, 34: 15607–15613.

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

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

PALMGREN, M.G. & NISSEN P. (2011). P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.*, 40: 243–66.

PEDERSEN, P. & CARAFOLI, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences*, 12: 146-150.

- PERONA, R. & SERRANO, R. (1988). Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature*, 334: 438-40.
- PORTILLO, F. (2000). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1469(1): 31-42.
- PORTILLO, F. & SERRANO, R. (1989). Growth control strength and active sites of yeast plasma membrane ATPase studies by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, 186: 501-507.
- PORTILLO, F.; ERASO, P. & SERRANO, R. (1991). Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.*, 287: 71-74.
- REINKE, A.; ANDERSON, S.; MCCAFFERY, J.; YATES, J.; ARONOVA, S.; CHU, S.; FAIRCLOUGH, S.; IVERSON, C.; WEDAMAN, K. & POWERS, T. (2004). TOR Complex 1 Includes a Novel Component, Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279(15): 14752-14762.
- RESHKIN, S.; GRECO, M. & CARDONE, R. (2014). Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369: 20130100.
- ROSA, M. F. & SA-CORREIA, I. (1991). In vivo Activation by Ethanol of Plasma Membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(3): 830-835.
- SCHLESSER, A.; ULASZEWSKI, S.; GHISLAIN, M. & GOFFEAU, A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 263: 19480-19487.
- SERRANO, R. (1980). Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory- deficient yeast. *Eur. J. Biochem.*, 105: 419-424.
- SERRANO, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.*, 156(1): 11-14.
- SERRANO, R. (1985). Plasma membrane ATPase of plants and fungi. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- SERRANO, R. (1991). Transport across Yeast Vacuolar and Plasma Membranes, in: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics* (Broach, J.R.; Pringle, J.R.; Jones, E.W. eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 523-585.
- SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT, M. & FINK, G.R. (1986). The yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na,K), (K) and (Ca) ATPases. *Nature*, 319: 689-693.
- SOPKO, R.; HUANG, D.; PRESTON, N.; CHUA, G.; PAPP, B.; KAFADAR, K.; SNYDER, M.; OLIVER, S. G.; CYERT, M.; HUGHES, T. R.; BOONE, C. & ANDREWS, B. (2006). Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell Biol.*, 21: 319-30.
- SUTTON, A.; IMMANUEL, D. & ARNDT, K. T. (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell Biol.*, 11(4): 2133-2148.
- UESONO, Y.; TOH-E, A. & KIKUCHI, Y. (1997). Ssd1p of *Saccharomyces cerevisiae* Associates with RNA. *J. Biol. Chem.*, 272(26): 16103-16109.

- VALLEJO, C. G. & SERRANO, R. (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast*, 5: 307-319.
- VIEGAS, C. & SA-CORREIA, I. (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol.*, 137(3): 645-651.
- VIEGAS, C.A.; SEBASTIÃO, P. B.; NUNES, A. G. & SÁ-CORREIA, I. (1995). Activation of plasma membrane H(+)-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1904-1909.
- WANG H.; WANG X. & JIANG Y. (2003). Interaction with Tap42 is required for the essential function of Sit4 and type 2A phosphatases. *Mol. Biol. Cell.*, 14: 4342-4351.
- WEDAMAN, K.P.; REINKE, A.; ANDERSON, S.; YATES, J.; MCCAFFERY, J.M., & POWERS, T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 14: 1204-1220.
- WINZELER, E.A.; SHOEMAKER, D.D.; ASTROMOFF, A.; LIANG, H.; ANDERSON, K.; ANDRE, B.; BANGHAM, R.; BENITO, R.; BOEKE, J.D.; BUSSEY, H.; CHU, A.M.; CONNELLY, C.; DAVIS, K.; DIETRICH, F.; DOW, S.W.; EL BAKKOURY, M.; FOURY, F.; FRIEND, S.H.; GENTALEN, E.; GIAEVER, G.; HEGEMANN, J.H.; JONES, T.; LAUB, M.; LIAO, H.; LIEBUNDGUTH, N.; LOCKHART, D.J.; LUCAU-DANILA, A.; LUSSIER, M.; M'RABET, N.; MENARD, P.; MITTMANN, M.; PAI C.; REBISCHUNG, C.; REVUELTA, J.L.; RILES, L.; ROBERTS, C.J.; ROSS-MACDONALD, P.; SCHERENS, B.; SNYDER, M.; SOOKHAI-MAHADEO, S.; STORMS, R.K.; VÉRONNEAU, S.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.; WARD, T.R.; WYSOCKI, R.; YEN, G.S.; YU, K.; ZIMMERMANN, K.; PHILIPPSSEN, P.; JOHNSTON, M. & DAVIS, R.W. (1999). Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*, 285(5429): 901-906.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R. & HALL, M. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124(3): 471-484.