

**BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE LA ALTERACIÓN DE
LA HOMEOSTASIS DEL PIROFOSFATO INORGÁNICO EN
EUCARIOTAS.**

Trabajo presentado para optar al grado
de Doctor en Bioquímica por la Licenciada
Gloria Serrano Bueno

Directores:

Aurelio Serrano Delgado

Investigador Científico del CSIC

Agustín Hernández López

Profesor Asociado
Universidad Pablo de Olavide

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El fósforo: un bioelemento mayoritario	1
1.2. El enlace pirofosfato	1
1.3. El pirofosfato inorgánico	2
1.3.1. <u>Generalidades</u>	2
1.3.2. <u>El papel regulador del pirofosfato</u>	3
1.3.3. <u>Contenido celular de pirofosfato y variación de la energía de hidrólisis</u>	4
1.3.4. <u>Producción de pirofosfato en el anabolismo celular</u>	7
1.3.5. <u>El pirofosfato en el compartimento nuclear</u>	9
1.4. Enzimas que hidrolizan pirofosfato: Pirofosfatasas inorgánicas	10
1.4.1. <u>Pirofosfatasas solubles</u>	10
1.4.1.1. Pirofosfatasas solubles Familia I	11
1.4.1.2. Pirofosfatasas solubles Familia II	14
1.4.2. <u>Pirofosfatasas de membrana translocadoras de protones</u>	15
1.5. Las pirofosfatasas en organismos eucariotas	17
1.5.1. <u>Las pirofosfatasas en eucariotas fotosintéticos</u>	17
1.5.2. <u>Las pirofosfatasas en hongos y metazoos</u>	20
1.6. La Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucariota	21
1.6.1. <u>Metabolismo celular</u>	23
1.6.2. <u>Muerte y ciclo celular</u>	26
1.7. Objetivos de la Tesis Doctoral	29

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Organismos y condiciones de cultivo	33
2.1.1. <u><i>Escherichia coli</i></u>	33
2.1.1.1. Estirpes de <i>E.coli</i>	33
2.1.1.2. Cultivo de <i>E.coli</i> en medio líquido	33
2.1.1.3. Cultivo de <i>E.coli</i> en medio sólido	33
2.1.2. <u>Levadura</u>	34

2.1.2.1.	Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas	34
2.1.2.2.	Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio líquido	34
2.1.2.3.	Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido	35
2.1.2.4.	Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medios especiales	35
2.1.3.	<u>Líneas celulares humanas</u>	36
2.1.3.1.	Líneas celulares utilizadas	36
2.1.3.2.	Cultivo en monocapa de fibroblastos	36
2.2.	Recogida de células	36
2.2.1.	<u>Recogida de células de <i>S. cerevisiae</i></u>	36
2.2.2.	<u>Recogida de células humanas</u>	37
2.3.	Preparación de extractos celulares	37
2.3.1	<u>Preparación de extractos celulares de <i>S. cerevisiae</i></u>	37
2.3.1.1.	Obtención de fracciones solubles	37
2.3.1.2.	Fraccionamiento subcelular: obtención de las fracciones citosólica y nuclear	37
2.3.1.3.	Preparación de membranas y extractos solubles	39
2.4.	Determinación de la actividad pirofosfatasa	39
2.4.1.	<u>Actividad pirofosfatasa soluble</u>	40
2.4.2.	<u>Actividad pirofosfatasa de membrana</u>	40
2.5.	Análisis de proteínas	41
2.5.1.	<u>Determinación de proteínas</u>	41
2.5.2.	<u>Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</u>	41
2.5.2.1.	Preparación de las muestras	41
2.5.2.2.	Desarrollo de la electroforesis mediante el método Laemmli	42
2.5.2.3.	Teñido de geles	42
2.5.3.	<u>Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa</u>	43
2.5.4.	<u>Inmunodetección por <i>Western blot</i></u>	43
2.6.	Métodos genéticos de manipulación del DNA	44
2.6.1.	<u>Plásmidos utilizados</u>	44
2.6.2.	<u>Métodos de transformación genética</u>	45
2.6.2.1.	Transformación de <i>E. coli</i>	45
2.6.2.2.	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	46
2.6.2.3.	Transfección transitoria de líneas celulares humanas	46

2.6.3. <u>Aislamiento del DNA</u>	47
2.6.3.1. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala	47
2.6.3.2. Aislamiento de DNA genómico de levadura	48
2.7. Análisis del DNA	48
2.7.1. <u>Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	48
2.7.1.1. Oligonucleótidos utilizados	49
2.7.2. <u>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</u>	50
2.7.3. <u>Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa</u>	51
2.7.4. <u>Determinación de la concentración y pureza del DNA</u>	51
2.7.5. <u>Restricción del DNA</u>	52
2.7.6. <u>Desfosforilación de extremos del DNA</u>	52
2.7.7. <u>Formación de extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes</u>	53
2.7.8. <u>Formación de extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes</u>	53
2.7.9. <u>Ligación de fragmentos de DNA</u>	54
2.7.10. <u>Secuenciación automática del DNA mediante marcaje fluorescente</u>	54
2.8. Aislamiento y análisis del RNA	54
2.8.1. <u>Aislamiento de RNA en <i>S. cerevisiae</i></u>	55
2.8.2. <u>Estimación de la concentración, pureza e integridad del RNA</u>	55
2.8.3. <u>Obtención de cDNA a partir de RNA</u>	56
2.8.4. <u>RT-PCR</u>	56
2.9. Análisis de secuencias de DNA y proteínas mediante métodos informáticos	56
2.10. Curva de crecimiento de los cultivos de levadura	57
2.11. Determinación de los niveles de pirofosfato celular	57
2.12. Determinación de los niveles celulares de piridín nucleótidos	57
2.13. Determinación de la viabilidad celular	58
2.14. Microscopia	58
2.14.1. <u>Análisis de localización subcelular mediante microscopia de fluorescencia</u>	58
2.14.2. <u>Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)</u>	59
2.14.3. <u>Evaluación de la autofagia con el colorante vital fluorescente FM4-64</u>	59
2.14.4. <u>Evaluación de apoptosis. Ensayo de TUNEL</u>	60
2.15. Determinación del tamaño celular	60
2.16. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo con yoduro de propidio	61

2.17. Determinación de la estabilidad proteica. Ensayo de pulso y caza	61
2.18. Estadística	62
3. RESULTADOS	
3.1. Mecanismo fisiológico de la toxicidad por exceso de PPI en el modelo eucariota <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
3.1.1. <u>Efecto de la deficiencia de Ipp1p en la viabilidad celular</u>	63
3.1.2. <u>Efecto de la deficiencia de Ipp1p en el ciclo celular</u>	67
3.1.3. <u>Efectos celulares de la depleción de Ipp1p dependientes del tipo de metabolismo</u>	70
3.1.4. <u>Efecto del lavado del exceso de PPI y la reactivación de Ipp1p</u>	76
3.1.5. <u>Determinación del mecanismo bioquímico que causa la muerte en células con metabolismo fermentativo</u>	81
3.1.6. <u>Determinación del mecanismo de muerte celular generado por el exceso de PPI en células con metabolismo fermentativo</u>	85
3.2. Implicaciones celulares y moleculares de la localización núcleo-citosólica de la sPPasa Ipp1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88
3.2.1. <u>Localización subcelular y niveles de expresión de la sPPasa Ipp1p en <i>S. cerevisiae</i></u>	88
3.2.2. <u>Generación de cepas con Ipp1p compartimentalizada en núcleo o citosol</u>	90
3.2.3. <u>Complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p en función de la localización subcelular de la sPPasa</u>	94
3.2.4. <u>Niveles de expresión de las quimeras de Ipp1p en función de la localización subcelular</u>	96
3.2.5. <u>Estabilidad y degradación de Ipp1p en el compartimento nuclear</u>	98
3.2.6. <u>Regulación nuclear de Ipp1p dependiente de la actividad PPasa</u>	101
3.3. Expresión y localización subcelular de sPPasas de diferentes orígenes en levadura y células de mamíferos	103
3.3.1. <u>Expresión heteróloga de sPPasas en levadura</u>	103
3.3.2. <u>Expresión heteróloga de sPPasas en células de mamífero</u>	113
3.4 Reproducción del escenario metabólico del PPI de células vegetales utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucariota	116

4. DISCUSIÓN	
4.1. Mecanismo fisiológico de la toxicidad por exceso de PPI en el modelo eucariota <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	121
4.2. Implicaciones celulares y moleculares de la localización núcleo-citosólica de la sPPasa Ipp1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	125
4.3. Expresión y localización subcelular de sPPasas de diferentes orígenes en levadura y células de mamífero	129
4.4. Reproducción del escenario metabólico del PPI de células vegetales utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucariota	132
5. CONCLUSIONES	135
6. BIBLIOGRAFÍA	137

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1:** Rutas de biosíntesis de NAD^+ en levaduras e invertebrados 8
- Figura 1.2:** Alineamiento de secuencias de diferentes sPPasas Familia I
12
- Figura 1.3:** Representación esquemática del escenario metabólico relacionado con las PPasas que aparecen en distintos compartimentos celulares en células eucariotas fotosintéticas y en células fúngicas o animales y sus relaciones con la reserva de Pi citosólica 18

3. RESULTADOS

- Figura 3.1.1:** Niveles de PPi celulares en las diferentes condiciones de cultivo 64
- Figura 3.1.2:** Niveles de sPPasa y actividad de hidrólisis de PPi en función de la fuente de carbono y el tiempo 65
- Figura 3.1.3:** Tasa de crecimiento en cultivos semi-continuos de células control, SG, CR y MR 66
- Figura 3.1.4:** Capacidad de supervivencia de la cepa YPC3 en las diferentes condiciones de cultivos 67
- Figura 3.1.5:** Análisis del ciclo celular de la cepa YPC3 en las diferentes condiciones de cultivo 68
- Figura 3.1.6:** Niveles de ciclinas en la cepa YPC3 en función del tipo de metabolismo 69
- Figura 3.1.7:** Tamaño celular en las diferentes condiciones de cultivo 71

Figura 3.1.8: Electroforesis en gel de agarosa de DNA genómico extraído de células YPC3 en las diferentes condiciones de cultivo	72
Figura 3.1.9: Acumulación de ROS en células YPC3	73
Figura 3.1.10: Autofagia en células YPC3 en función del metabolismo energético	74
Figura 3.1.11: Acumulación de autofagosomas en vacuolas de células YPC3	75
Figura 3.1.12: Tasa de crecimiento de células MR lavadas con medio fresco YPGal o YPGli	76
Figura 3.1.13: Capacidad de formar colonias individuales de células MR lavadas con medio fresco YPGal o YPGli a lo largo del tiempo	77
Figura 3.1.14: Irreversibilidad de la parada de ciclo celular en condiciones fermentativas	79
Figura 3.1.15: Reanudación del ciclo celular en células MR	80
Figura 3.1.16: Alteración de parámetros celulares por incremento de los niveles de NAD ⁺ utilizando acetaldehído	83
Figura 3.1.17: Alteración de parámetros celulares por incremento de los niveles de NAD ⁺ mediante sobreexpresión de Nqr1p	84
Figura 3.1.18: Efectos celulares del bloqueo de las últimas fases de la autofagia en la muerte por exceso de PPI	86
Figura 3.1.19: Efectos celulares del bloqueo las fases iniciales de la autofagia en la muerte por exceso de PPI	87
Figura 3.2.1: Niveles de proteína y actividad específica de Ipp1p en fracciones nucleares y citosólicas, representación esquemática de la construcción con la quimera Ipp1p-yEGFP y localización subcelular de Ipp1p	89
Figura 3.2.2: Representación esquemática de las construcciones génicas con yEGFP y los motivos NLS y NES, utilizadas para confinar a la sPPasa mayoritaria de levadura Ipp1p en el núcleo o el citosol, respectivamente	91
Figura 3.2.3: Localización subcelular de Ipp1p en las diferentes cepas	92

Figura 3.2.4: Niveles de proteína Ipp1p (quimeras con yEGFP) en extractos citosólicos y nucleares de las diferentes cepas transformantes	93
Figura 3.2.5: Niveles de actividad específica sPPasa de las fracciones nucleares y citosólicas de las cepas transformantes	93
Figura 3.2.6: Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 (medio con glucosa) por las sPPasas quiméricas de distinta compartimentación subcelular usadas en este trabajo	94
Figura 3.2.7: Curvas de crecimiento en medio líquido con glucosa (YPD) de las estirpes de <i>S. cerevisiae</i> W303-1a y su derivada YPC3 transformada con las construcciones génicas que codifican sPPasas Ipp1p quiméricas de diferente localización subcelular	95
Figura 3.2.8: Ensayos de goteo de las diferentes cepas tras crecimiento en condiciones estándar o en condiciones de hambre absoluta (agua + glucosa 2%)	96
Figura 3.2.9: Niveles de transcrito del gen <i>IPP1</i> cromosómico nativo y sus construcciones génicas quiméricas en condiciones de co-expresión (galactosa) y represión (glucosa) del gen cromosómico	97
Figura 3.2.10: Niveles de proteínas Ipp1p y de actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de cepas YPC3 transformantes cultivadas en condiciones de co-expresión (galactosa) y represión (glucosa) del gen <i>IPP1</i> cromosómico	98
Figura 3.2.11: Experimento de pulso y caza para determinar diferencias en la estabilidad de las proteínas Ipp1p quiméricas con diferente localización subcelular	99
Figura 3.2.12: Niveles de proteína Ipp1p y actividad específica sPPasa de extractos celulares totales de diversas estirpes silvestres y mutantes en diferentes sistemas de degradación selectiva de proteínas celulares	100
Figura 3.2.13: Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos de distintas sPPasas. Mutaciones realizadas para generar la construcción IPP1*-NLS	101
Figura 3.2.14: Niveles de proteína Ipp1p y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de cepas transformantes YPC3, expresoras de proteínas quiméricas nucleares Ipp1p activas o carentes de actividad catalítica	102

Figura 3.3.1: Representación esquemática de las construcciones génicas utilizadas para la expresión heteróloga de sPPasas en levadura	104
Figura 3.3.2: Localización subcelular determinada mediante microscopia de fluorescencia de las diferentes sPPasas recombinantes expresadas en la cepa YPC3 de <i>S. cerevisiae</i>	105
Figura 3.3.3: Complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p endógena por las diferentes sPPasas heterologas quiméricas de origen vegetal y microbiano	107
Figura 3.3.4: Curvas de crecimiento en medio líquido con glucosa (YPD) de las estirpes de <i>S. cerevisiae</i> W303-1a y una serie de transformantes de su derivada YPC3 expresoras de sPPasas recombinantes de origen vegetal y microbiano y de diversa localización subcelular	108
Figura 3.3.5: Niveles de proteínas quiméricas y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 transformantes	110
Figura 3.3.6: Actividad sPPasa específica de ScIPP1 y SmPPA	111
Figura 3.3.7: Niveles de sPPasas quiméricas y actividad PPasa específica en extractos celulares totales de cepas YPC3 y BJ5459 transformadas con las quimeras ScIPP1-yEGFP y AtPPA6-yEGFP	112
Figura 3.3.8: Representación esquemática de las construcciones génicas utilizadas para la expresión heteróloga de sPPasas en células de mamífero	113
Figura 3.3.9: Localización subcelular determinada mediante microscopia de fluorescencia de las diferentes sPPasas recombinantes expresadas en células de fibroblastos humanos HEK-293T	114
Figura 3.4.1: Complementación funcional de la deficiencia en V-ATPasa por una H ⁺ -PPasa quimérica (TcGFPAVP1) co-expresada con Ipp1p en diversas localizaciones subcelulares	118
Figura 3.4.2: Niveles de actividad PPasa en las fracciones soluble y de membranas en las diferentes cepas que co-expresan TcGFPAVP1 y variantes de Ipp1p con diferentes localizaciones subcelulares	119

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y TABLAS**1. INTRODUCCIÓN**

Esquema 1: Reacciones anabólicas que producen pirofosfato como subproducto	7
Esquema 2: Reacciones directa e inversa (pirofosforolisis) catalizadas por la DNA polimerasa	9
Tabla I: Algunas ciclinas implicadas en la regulación del ciclo celular de vertebrados y levaduras	27

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla II: Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	34
Tabla III: Plásmidos utilizados	45
Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados	49

3. RESULTADOS

Tabla V: Contenido de coenzimas piridin nucleótidos en células de levadura	81
Tabla VI: Genes de las sPPasas utilizados para la expresión heteróloga en levadura	104
Tabla VII: Genes de las sPPasas utilizados para la expresión heteróloga en células de mamíferos	113

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μ	Micro
Abs	Absorbancia
AcilcoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosín-difosfato
AMP	Adenosín-monofosfato
Apdo	Apartado
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosín-trifosfato
BafA	Bafilomicina A
bisacrilamida	N,N'-bis-metilén-acrilamida
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificante
cm	Centímetro
CR	<i>Caloric Restriction</i> (0,5 % glucosa)
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DHR-123	Dihidrorodamina-123
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DNEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
dNTP	Mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
etc	Etcétera
Fig.	Figura
g	Gramo
g	Aceleración de la gravedad

GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
h	Hora
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
H⁺-PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones
Hz	Herzio
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio-β-galactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KJ	Kilojulio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
l	Litro
LB	Medio de Luria-Bertani
m	Metro
M	Molar
mA	Miliamperio
MES	Ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MOPS	Ácido-3-(N-morfolino)propanosulfónico
MR	<i>Mandatory Respiration</i> (3% glicerol)
NAD⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Hidrógeno-nicotinamida-adenín-dinucleótido
NES	Señal de exclusión nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetro
NP-40	Detergente Nonidet P-40
N-terminal	Extremo amino terminal
°C	Grados Centígrados
O.D.	Densidad óptica
ORF	Pauta abierta de lectura (<i>Open Reading Frame</i>).

OVO	Ovalbúmina
P	Fósforo
Pi	Fosfato inorgánico
p.e.	Por ejemplo
p/v	Relación peso/volumen
P-ATPasa	ATPasa translocadora de protones localizada en la membrana plasmática
pb	Pares de nucleótidos (bases)
PBS	Tampón fosfato salino
PCI	Mezcla fenol:clorofomo:alcohol isoamílico (25:24:1)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PFK	Fosfofructoquinasa
PFP	Fosfofructoquinasa dependiente de P _{Pi}
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
poliP	Polifosfatos
PPasa	Pirofosfatasa
PPi	Pirofosfato
PPK	Polifosfato quinasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SD	Medio sintético selectivo de levadura con 2% de glucosa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
S.E.	Error estándar de la media aritmética
SG	<i>Stándar Glucose</i> (2% glucosa)
SGal	Medio sintético selectivo de levadura con 2% de galactosa
sp.	Especie

sPPasas	Pirofosfatasas solubles
t	Tiempo
TBE	Tampón Tris-borato/EDTA
TBS	Tampón Tris-NaCl
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampón Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tritón X-100	t-Octilfenoxipolietoxietanol
tRNA	RNA transferente
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano
U	Unidades
UBQ	Ubiquitina
UV	Ultravioleta
V	Voltio
v/v	Relación volumen/volumen
V-ATPasa	ATPasa translocadora de protones localizada en vacuola y Golgi
V-PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones de la membrana vacuolar
W	Watio
YNB	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico
YPD	Medio rico de levadura con 2% de glucosa
YPD 0.5%	Medio rico de levadura con 0.5% de glucosa
YPGal	Medio rico de levadura con 2% de galactosa
YPGli	Medio rico de levadura con 3% de glicerol

Bases nitrogenadas**A** Adenosina**C** Citosina**G** Guanina**T** Timina**Aminoácidos****A Ala** Alanina**R Arg** Arginina**N Asn** Asparragina**D Asp** Ácido Aspártico**C Cys** Cisteína**E Glu** Ácido Glutámico**Q Gln** Glutamina**G Gly** Glicina**H His** Histidina**I Ile** Isoleucina**L Leu** Leucina**K Lys** Lisina**M Met** Metionina**F Phe** Fenilalanina**P Pro** Prolina**S Ser** Serina**T Thr** Treonina**W Trp** Triptófano**Y Tyr** Tirosina**V Val** Valina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El fósforo: un bioelemento mayoritario

De los seis bioelementos primordiales que son asimilados por los organismos vivos (H, C, O, N, P y S) el fósforo (P) es el quinto en importancia cuantitativa como componente celular. Sin embargo, este bioelemento es parte fundamental del armazón de numerosas biomoléculas (ácidos nucleicos, coenzimas y metabolitos), es un componente esencial de las membranas lipídicas y forma complejos con proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos. El P es, además, único entre los bioelementos primordiales porque juega un papel clave en bioenergética ya que es el componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que se genera y consume en el metabolismo celular (Losada M 1999).

En contraste con los restantes bioelementos primordiales, el P no cambia su estado de oxidación al incorporarse a la materia viva, sino que, tras ser transportado al interior celular en forma de anión ortofosfato (H_2PO_4^- , Pi), sufre un proceso ácido-base por el que se energiza a metafosfato ($\sim\text{PO}_3^-$) cuando es incorporado a esqueletos carbonados para formar nucleósidos trifosfato, fundamentalmente ATP ($\text{ADP}\sim\text{PO}_3^-$). En esta molécula y otras similares forma parte de la estructura química denominada grupo pirofosfato ($\text{PO}_3^{2-}\sim\text{O}\sim\text{PO}_3^{2-}$), cuya energía de enlace es utilizada por todos los organismos. En el proceso subsiguiente de desenergización, el $\sim\text{PO}_3^-$ se hidrata directa o indirectamente y pasa de nuevo a ortofosfato (Pi) (Losada M 1999).

Una vez en el interior de las células, el Pi puede almacenarse en forma de compuestos de reserva de polifosfatos en el citosol como en el caso de muchos procariotas, o bien acumularse en algún compartimento celular eucariótico como en las vacuolas celulares. En estos orgánulos la concentración de Pi puede ser varios órdenes de magnitud superior a la del citoplasma. Además, el Pi puede encontrarse también en forma de polímeros inorgánicos en estas mismas localizaciones (Rao, Roberts et al. 1985; De la Rosa, Hervás et al. 1990).

1.2 El enlace pirofosfato

En los organismos vivos, prácticamente todo el fósforo se encuentra como ortofosfato, bien libre (Pi) o esterificado mediante un grupo carboxilo a una cadena hidrocarbonada (C-O-P), como en los azúcares-fosfato y los fosfolípidos, o bien unido a

otro fosfato por un puente pirofosfato (R-P-O-P-R'), como en los polifosfatos y los nucleósidos di- y tri-fosfato. Una característica relevante del enlace éster fosfato, bien como pirofosfato o asociado a un grupo carboxilo o enol, es la de poseer una relativa estabilidad cinética a temperatura y pH fisiológicos y una elevada energía libre de hidrólisis. La principal característica de los compuestos de fosfato ricos en energía radica precisamente en la estabilidad cinética que el fosfato les confiere, protegiéndolos de su labilidad en solución acuosa y evitando, en consecuencia, la rápida descomposición a que naturalmente tienden por su inestabilidad energética. Así, los compuestos ricos en energía anhídrido acético, acetil-fosfato y difosfato (pirofosfato inorgánico, PPi) tienen una energía libre de hidrólisis similar, pero su estabilidad cinética en disolución acuosa aumenta enormemente por la presencia de Pi en sus moléculas: segundos para el anhídrido acético, horas para el acetil-fosfato y años para el PPi (Losada, Vargas et al. 1999). La energía almacenada en el fosfato energizado (~P) puede ser así utilizada por la célula para múltiples funciones fisiológicas, entre ellas para dirigir los procesos anabólicos (Lahti, Pitkäranta et al. 1988).

1.3 El pirofosfato inorgánico

1.3.1 Generalidades

El pirofosfato inorgánico (PPi) es una molécula sencilla constituida por dos grupos metafosfato unidos por un puente de oxígeno. La estructura P-O-P que la caracteriza, conocida como puente pirofosfato, constituye el grupo químico en el que se almacena la energía de enlace fundamental para la energética celular. Por tanto, además del ATP, el PPi también es una molécula rica en energía, y como su potencial de energía es muy similar ($\Delta G^{\circ} = -22 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ó $-0,22 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$ y $\Delta G^{\circ} = -31 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ó $-0,31 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$ para el PPi y ATP, respectivamente) en teoría podría llevar a cabo funciones similares en bioenergética. Sin embargo, al contrario que ocurre con el ATP, la energía libre de hidrólisis del PPi se hace mayor al disminuir el pH, por lo que la hidrólisis del PPi sería mucho más favorable en condiciones de pH citoplasmático bajo (De Meis 1984; Davies, Poole et al. 1992).

La primera reacción biológica descrita en la que intervenía esta molécula fue la reacción reversible de la formación de ATP y NMN en presencia de NAD^+ y PPi

(Kornberg 1948). Desde entonces, han sido descritas un gran número de reacciones biosintéticas (p.e., las polimerizaciones de aminoácidos y nucleótidos para dar proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente) que hidrolizan nucleósidos trifosfato generando PPi. En consecuencia, se consideró durante mucho tiempo a este compuesto como un producto de desecho del anabolismo celular cuya hidrólisis posterior permite que las reacciones anabólicas procedan eficientemente en el sentido correcto (Lahti, Pitkaranta et al. 1988). Debido a que todas las formas de vida requieren una fuente de energía química libre para sobrevivir y que las primeras formas de vida tendrían un metabolismo energético más simple y poseerían polifosfatos de menor peso molecular, la hipótesis de que el PPi sea el antecesor del ATP como moneda energética en las primeras etapas de la evolución ha estado sometida a debate (Baltscheffsky 1997).

1.3.2 El papel regulador del pirofosfato

El pirofosfato actúa también como regulador de numerosas reacciones bioquímicas, ya que es capaz de inhibir o activar algunas enzimas, regular la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, afectar a la formación de tejidos calcificados, a la proliferación celular y al transporte de hierro en la célula, etc. Diversos autores han demostrado que el PPi afecta a las enzimas *in vitro*, siendo la inhibición de la actividad enzimática por parte de este metabolito la característica más importante, aunque experimentos más recientes han demostrado que el PPi es capaz también de activar o proteger la inactivación catalítica de ciertas enzimas. Un ejemplo claro sobre el papel regulador del PPi se demuestra en aquellas reacciones enzimáticas que requieren el catión divalente Mg^{2+} . Debido a que el PPi tiene la capacidad de unirse fuertemente a este ion, puede inhibir a ciertas estas enzimas si su concentración en la mezcla de reacción es similar o mayor que la del catión (O'Sullivan and Smithers 1979). La fosfoproteína fosfatasa es un ejemplo interesante de este tipo de enzimas que se inactivan por PPi. Se ha demostrado que en presencia de 0,25 mM de PPi, la actividad de esta enzima se inhibe en un 75% al cabo de 10 min en células de hígado de ratas (Khandelwal 1978). Además, el PPi puede contribuir al efecto opuesto aumentando la actividad de ciertas enzimas. En la bacteria *Serratia marcescens* la actividad de la citosina deaminasa aumenta en un 90% en presencia de 1 mM de PPi (Yu 1976). Resultados similares se obtuvieron con la bacteria *Salmonella typhimurium* (West

1985). En todos estos casos el PPi aumenta la actividad enzimática porque es capaz de retirar trazas de metales pesados que inhiben a la reacción formando complejos con ellos.

En *Escherichia coli*, se ha sugerido que este metabolito está implicado en la regulación del transporte de hierro al interior celular, aumentando la tasa de crecimiento celular en medio mínimo con 10 mM de PPi (Perrotte-Piquemal, Danchin et al. 1999). La forma en la que el PPi estimula el transporte de hierro dentro de las células de *E. coli* aún no se conoce, pero su efecto es claro y se ha propuesto que el PPi tiene un papel clave en el metabolismo del hierro en las células eucarióticas. También en *E. coli*, el PPi está relacionado con la inhibición de la síntesis de glucógeno (Preiss and Greenberg 1983). En humanos y otros animales, donde no se han encontrado enzimas dependientes de PPi, la variación en los niveles extracelulares de este metabolito se ha asociado con distintas enfermedades y desórdenes metabólicos. En estos organismos, los niveles de fosfato intracelular estimulan la actividad de las ATPasas (Kalashnikova, Milgrom et al. 1988; Jault, Paik et al. 1994), inhiben algunas actividades enzimáticas (Hakki and Sitaramayya 1990), afectan a la absorción de hierro (Cowart, Swope et al. 1986) y tienen efectos no bien caracterizados sobre la replicación del DNA, la síntesis de proteínas y la liberación de calcio mitocondrial (Terkeltaub 2001).

1.3.3 Contenido celular de pirofosfato y variación de la energía de hidrólisis

Debido a que las reacciones biosintéticas producen grandes cantidades de PPi, muchos autores consideraron que con el fin de desplazar el equilibrio de estas reacciones anabólicas, este metabolito era hidrolizado inmediatamente por las sPPasas, encontrándose a muy bajas concentraciones en el interior de las células vivas (Kornberg 1957). Sin embargo, desde los años 50, se han realizado medidas de las concentraciones de PPi en el citosol de diversos organismos. Estos datos han demostrado la existencia de cantidades importantes de PPi citosólico, y que este metabolito puede actuar *in vivo* como una fuente de energía para las reacciones catalizadas por enzimas dependientes de pirofosfato como la UDP-Glucosa pirofosforilasa y la fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa pirofosfato dependiente en el citosol, o en las pirofosfatasas de membrana, capaces de bombear protones de forma acoplada a la hidrólisis de PPi.

En bacterias, se determinó que la concentración de PPi intracelular en células *E. coli* era de 500 μM , y que este valor era prácticamente independiente del nivel de

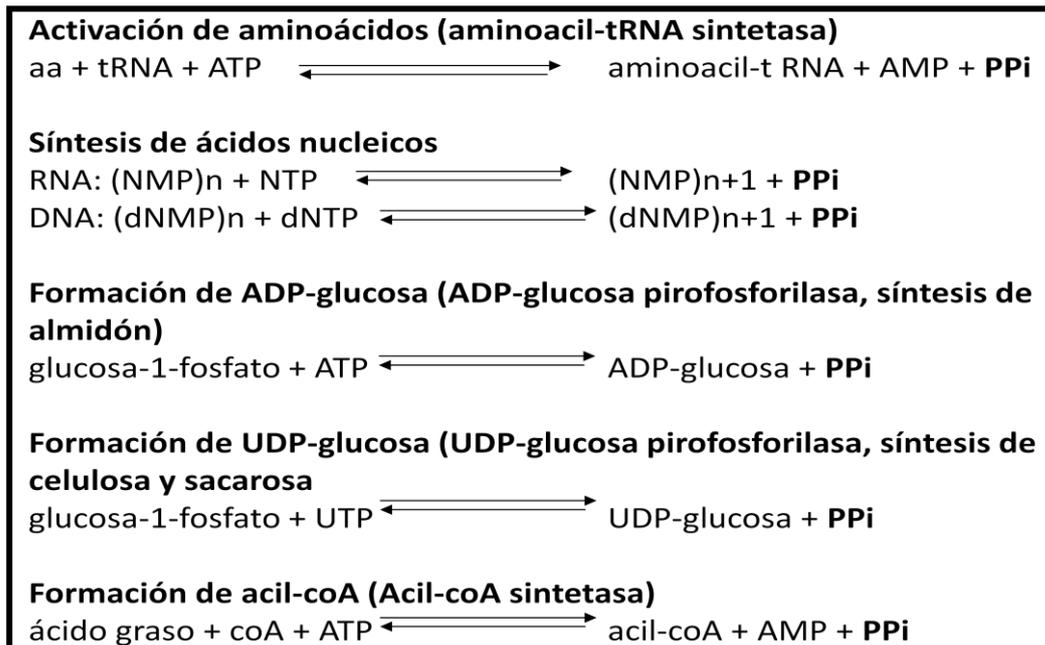
actividad pirofosfatasa (Kukko-Kalske, Lintunen et al. 1989). Se ha demostrado que menos del 10% de la actividad PPasa es suficiente para hidrolizar el PPi que proviene de las reacciones biosintéticas cuando se crecen células de *E. coli* en medio mínimo (Chen, Brevet et al. 1990). En la cianobacteria *Anacystis nidulans* se han detectado concentraciones más elevadas de PPi: 900 μM en oscuridad y 1,6 mM en presencia de luz (Bornefeld 1981). Este mismo efecto tiene lugar en las bacterias fotosintéticas, si bien en presencia de luz se detecta una concentración de 43 mM de PPi en células de *Rhodospirillum rubrum* (Nyren, Nore et al. 1991). Debido a que es imposible que existan concentraciones tan altas de PPi soluble en el citosol, los autores proponen que éste se encuentra formando complejos insolubles con distintos metales en gránulos, así como que el pirofosfato es utilizado como fuente energética para mantener la fuerza protón motriz en condiciones de oscuridad.

También se ha estudiado la concentración de PPi intracelular en diversos protistas, como la ameba parásita *Entamoeba histolytica*, que contiene una concentración 180 μM de PPi en el citosol. Este autor también calculó que el ΔG para el PPi citosólico era de $-25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Reeves 1976). Resultados similares fueron obtenidos por Takeshige en 1989, quienes detectaron una concentración de 193 μM de PPi en el citoplasma del alga *Chara corallina* y calcularon un ΔG del PPi de $-18,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Alrededor de los años 80, surgió un gran interés en el estudio de la concentración de PPi celular en plantas tras el descubrimiento de la fosfofructoquinasa dependiente de PPi (Carnal and Black 1979). Esta enzima utilizaba como fuente energética este metabolito en lugar de ATP. En 1984 se realizaron estimaciones de los contenidos tanto en PPi como en ATP de distintos tejidos de *Pisum sativum* y de *Zea mays* (Smyth and Black 1984). En plántulas de guisante de 4 días, las cantidades de PPi encontradas fueron de 16, 14 y 9 nmol por g de peso fresco en tallos, raíces y cotiledones, respectivamente. Mientras que las cantidades de ATP fueron 113, 98 y 249 nmol por g de peso fresco. En plántulas de maíz de 6 días, los tallos, raíces y escutelos contenían, respectivamente, 39, 23 y 15 nmol de PPi por g de peso fresco y 158, 33 y 391 nmol ATP por g de peso fresco. En el mismo año, se realizaron estimaciones de la concentración de PPi en extractos sin fraccionar de distintos tejidos de la planta *Pisum sativum* L., y se encontraron cantidades de $9,4 \pm 1,19$ y $8,9 \pm 0,47$ nmol por g de peso fresco en cotiledones en fase de desarrollo y en raíces apicales, respectivamente (Edwards 1984). Asumiendo que todo el PPi celular se encontrara en el citosol y que el

volumen de éste fuera aproximadamente el 10% del volumen celular total, la concentración de PPI en ambos tejidos estaría en torno a 90 μM . Ambos grupos propusieron de acuerdo con los resultados encontrados, que en el citosol de las células de plantas existían cantidades suficientes de PPI como para que este metabolito pudiera actuar como donador de energía para las distintas enzimas dependientes de pirofosfato. Se han realizado numerosos estudios en diferentes tejidos de distintas plantas, y en la mayoría de los casos la concentración de PPI se encuentra entre valores de 10 a 50 nmoles por g de peso fresco. Weiner llevó a cabo en 1987 un estudio sistemático en distintos orgánulos celulares de hojas de espinaca, encontrando que el 90% del PPI celular se encuentra localizado en el citosol (Weiner 1987). La concentración citosólica de PPI se estimó en 0,2-0,3 mM. Las concentraciones milimolares de PPI y Pi fueron determinadas por RMN en distintas condiciones de iluminación del tejido fotosintético, lo que permitió observar que así como la concentración de Pi se reducía de 25 a 10 mM cuando la planta pasaba de la oscuridad a la luz, en el caso del PPI no se producía ninguna variación.

En organismos no fotosintéticos como el hígado de rata, la concentración de PPI se ha estimado en torno a 6 μM y la energía de hidrólisis de este metabolito estaría en torno a $-17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Cook, King et al. 1980). Sin embargo, este organismo presenta una concentración de 100 μM de PPI en mitocondria. El contenido total de PPI detectado en el hígado de rata es bastante similar al que se encuentra en tejidos de plantas, siendo la distribución de este metabolito dentro de la célula muy diferente entre ambos. Mientras que la mayoría del PPI se encuentra en el citoplasma en células de plantas, en células de hígados de ratas se localiza mayoritariamente en la mitocondria. Esta diferencia tiene mucho sentido en cuanto a energética se refiere, ya que en plantas existen al menos tres enzimas diferentes capaces de usar el PPI citosólico como fuente de energía disponible (PFP, EC. 2.7.1.90; H^+ -PPasa, EC. 3.6.1.1; UDPG-pirofosforilasa, EC. 2.7.7.9) y ninguna de ellas en tejidos de animales.

1.3.4 Producción de pirofosfato en el anabolismo celular

Esquema 1: Reacciones anabólicas que producen PPi como subproducto.

El PPi se genera por la hidrólisis de nucleósidos trifosfato en un gran número de reacciones biosintéticas (Esquema 1), como son la síntesis de ácidos nucleicos (DNA y RNA), proteínas, polisacáridos, lípidos isoprenoides, aminoácidos, ácidos grasos y muchos metabolitos, (Geigenberger, Hajirezaei et al. 1998; Stitt 1998; Rojas-Beltrán, Dubois et al. 1999; Farre, Bachmann et al. 2001; Sonnewald 2001). Concretamente la síntesis de proteínas (aminoacilación de tRNA) produce el 74% del PPi celular en *E.coli*, y la síntesis de ácidos nucleicos contribuye en un 8% (Klemme 1976).

En consecuencia, durante mucho tiempo se ha considerado a este compuesto como un producto de desecho del anabolismo celular cuya hidrólisis posterior permite que las reacciones anabólicas procedan eficientemente en la dirección correcta (Lahti, Pitkäranta et al. 1988). Además, la hidrólisis del PPi es necesaria para renovar la concentración celular de fosfato inorgánico (Pi), necesario para regenerar el ATP en las reacciones de fosforilación (Pérez-Castiñeira, Gómez-García et al. 2001).

La primera ruta de biosíntesis descrita en la que participa el PPi, es la ruta de síntesis de coenzima NAD^+ (Kornberg 1948). El NAD^+ es un cofactor que participa en cientos de reacciones redox esenciales para la transducción de energía y el metabolismo celular. Además el NAD^+ actúa como sustrato para la modificación covalente de proteínas nucleares por ADP-ribosilación, un proceso implicado, entre otros, en la

reparación del ADN y la regulación de la inestabilidad genómica (Ziegler and Oei 2001). Igualmente se ha descrito su papel como co-sustrato de sirtuinas implicadas en la regulación del silenciamiento génico (Guarente 2000), así como su participación en las vías de señalización mediadas por calcio (Ziegler and Oei 2001). Existen dos vías diferentes para la biosíntesis de NAD^+ : vía reciclaje y vía *de novo*. En ambas existen reacciones que generan PPi como producto (Figura 1.2).

- **Quinolinato fosforribosil transferasa** (gen *QPTI*): Participa en la vía “*de novo*”, y cataliza la síntesis de ácido nicotínico mononucleótido (NAMN) a partir de quinolato y 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP).
- **Nicotín fosforribosil transferasa** (gen *NPTI*): Participa en la vía reciclaje, y cataliza la conversión de ácido nicotínico (NA) en ácido nicotínico mononucleótido (NAMN).
- **Ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa** (gen *NMAI,2*): Es una enzima que participa en ambas vías de síntesis de NAD^+ y cataliza la condensación del ácido nicotínico mononucleótido con AMP para producir desamino-NAD.
- **Nicotinamida adenin dinucleótido sintasa** (gen *QNSI*): Es una enzima que participa en ambas vías de síntesis de NAD^+ y cataliza la formación de enlaces carbono-nitrógeno a partir de ATP y desamino-NAD para generar NAD.

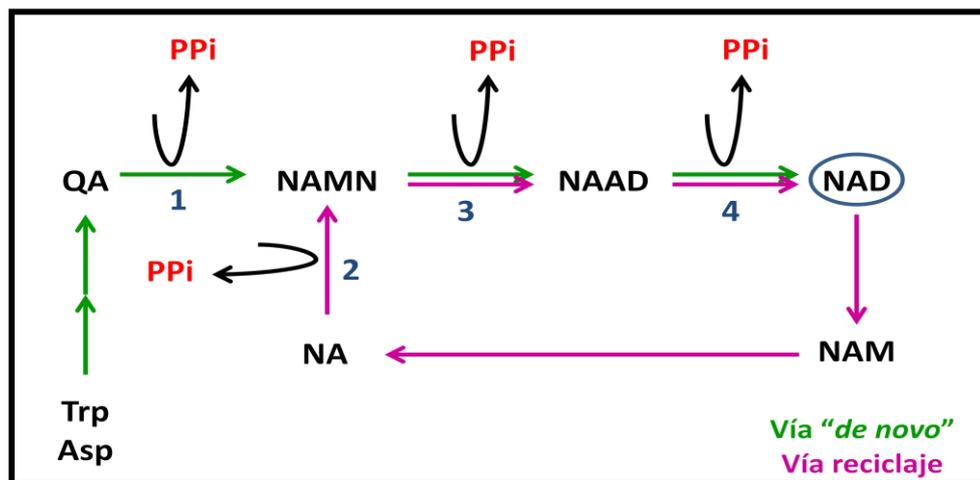


Figura 1.1: Rutas de biosíntesis de NAD^+ en levaduras e invertebrados. Las enzimas que catalizan reacciones productora de PPi son 1) Quinolinato fosforribosil transferasa (gen *QPTI*), 2) Nicotín fosforribosil transferasa (gen *NPTI*), 3) Ácido nicotínico mononucleótido adenil transferasa (gen *NMAI,2*), 4) Nicotinamida adenin dinucleótido sintasa (gen *QNSI*).

1.3.5 El pirofosfato en el compartimento nuclear

En el compartimento nuclear de las células eucariotas tienen lugar numerosas reacciones anabólicas, siendo la replicación y la transcripción del DNA dos de los procesos más importantes y frecuentes en la célula. Las enzimas implicadas para ambos procesos son las DNA y RNA polimerasas respectivamente. Ambas proteínas catalizan la adición de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos trifosfato a una cadena de DNA o RNA. La reacción fundamental es una transferencia de un grupo fosfato mediante ataque nucleofílico, liberándose PPi inorgánico y elongándose el DNA o RNA al formarse un nuevo enlace fosfodiéster.

Por otro lado, en el compartimento nuclear existen otras reacciones catabólicas que utilizan PPi como sustrato, un ejemplo es la pirofosforolisis. Las DNA polimerasas además de llevar a cabo la duplicación del DNA, catalizan una reacción conocida como pirofosforolisis o inversa de la replicación (Esquema 2). Ésta consistente en la liberación de dNTPs del extremo 3' de una estructura molde/iniciador mediante la adición de PPi como sustrato en presencia de iones divalentes (Deutscher and Kornberg 1969). Se postula que es una reacción importante ya que facilitaría la desincorporación de nucleótidos erróneos introducido en el proceso de duplicación del DNA. De acuerdo con esto, *in vitro*, se ha descrito que el PPi puede aumentar la fidelidad de la DNA polimerasa Dpo4 de levaduras durante la replicación del DNA mediante el estancamiento de la extensión del cebador. Ésto impide la incorporación del siguiente dNTP y promueve la pirofosforolisis de nucleótidos mal incorporados a la cadena de DNA (Vaisman, Ling et al. 2005).

Replicación del DNA



Pirofosforolisis

Esquema 2: Reacciones directa e inversa (pirofosforolisis) catalizadas por la DNA polimerasa.

La presencia, en el compartimento nuclear, de reacciones anabólicas reprimibles por PPi y de reacciones catabólicas que requieren este metabolito, convierten la presencia de PPi en el núcleo en un tema controvertido y plantea la hipótesis de la

necesidad de una regulación de los niveles de PPi en el núcleo celular.

1.4 Enzimas que hidrolizan PPi: pirofosfatasas inorgánicas

Las pirofosfatasas inorgánicas (EC 3.6.1.1) son enzimas ubicuas que hidrolizan PPi para regenerar Pi. Su actividad es esencial para que las reacciones biosintéticas ocurran en la reacción correcta de forma irreversible (Sivula, Salminen et al. 1999). Se pueden clasificar en dos grupos en función de su estructura y actividad catalítica: pirofosfatasas solubles y de membrana. Aunque ambos tipos se engloban bajo el mismo código de identificación de enzimas (EC 3.6.1.1) y poseen motivos similares en la secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio catalítico, no son enzimas homólogas (Rea and Poole 1993). Ambos tipos de pirofosfatasas inorgánicas requieren, sin embargo, Mg^{2+} como cofactor para la estabilidad de la holoenzima y como activador de la catálisis. Además, el sustrato de la enzima es realmente un complejo $Mg^{2+}\cdot PPi$ y se inhibe reversiblemente por iones de Ca^{2+} (Rojas-Beltrán, Dubois et al. 1999).

1.4.1 Pirofosfatasas solubles

Las pirofosfatasas solubles (sPPasas) hidrolizan eficientemente el PPi liberando calor. Son enzimas ubicuas y su actividad es esencial para hidrolizar el PPi. Las sPPasas se dividen en dos grandes familias no homólogas, Familia I y Familia II, atendiendo a su estructura primaria (Cooperman, Baykov et al. 1992; Shintani, Uchiumi et al. 1998).

Debido a su papel central en el metabolismo, estas enzimas están presentes en todos los organismos vivos conocidos (Kukko-Kalske and Heinonen 1985; Chen, Brevet et al. 1990), habiéndose identificado en organismos procarióticos, en el citosol de células animales y hongos, así como en las matrices mitocondrial y cloroplástica de diversos eucariotas (Pérez-Castiñeira, López-Marqués et al. 2001; Gómez-García, Losada et al. 2006). Algunas de estas sPPasas poseen un dominio que les permite anclarse a la membrana interna de los orgánulos en los que se encuentran (cloroplasto, mitocondria) (Lundin, Deopujari et al. 1992; Baykob, Dubnova et al. 1993; Sivula, Salminen et al. 1999).

La ubicuidad y carácter esencial de las pirofosfatasas solubles, vienen determinados por su papel central en el metabolismo, ya que en su ausencia la

acumulación de PPi colapsaría todas las reacciones biosintéticas (Kukko-Kalske and Heinonen 1985; Chen, Brevet et al. 1990). Además, la hidrólisis del PPi es esencial para el reciclaje del Pi necesario para el metabolismo celular y la fosforilación, cerrando de esta forma el ciclo intracelular del fósforo. En plantas y ciertas bacterias, las sPPasas también participan en la asimilación de nutrientes minerales. Las sPPasas son, por tanto, proteínas clave para el normal desarrollo del metabolismo, disipando la energía de hidrólisis del enlace P-O-P en forma de calor.

1.4.1.1 Pirofosfatasa solubles Familia I

Esta familia engloba la mayoría de sPPasas conocidas y están presentes tanto en organismos procariotas (bacterias y arqueas) como eucariotas (hongos, plantas y animales). Todas las sPPasas Familia I se caracterizan por poseer el dominio PROSITE, DXDPXD, que define a la sPPasa arquetípica (Cooperman, Baykov et al. 1992). Poseen un sitio activo estructuralmente muy conservado formado por 13 de los 17 residuos de aminoácidos conservados en todas las sPPasas Familia I conocidas (Figura 1.2).

Desde el punto de vista estructural, las sPPasas Familia I pueden dividirse en PPasas de origen procariota y de origen eucariota, siendo las sPPasas de *E. coli* y *S. cerevisiae* (Ipp1p) las más estudiadas hasta la fecha como ejemplares de cada tipo de origen. Todas las PPasas funcionan como homo-oligómeros, las sPPasas de origen procariota son homohexámeros constituidos por monómeros de aproximadamente 20 kDa, mientras que las de origen eucariota funcionan como homodímeros con monómeros de entre 32-37 kDa.

Estructuralmente, los monómeros que componen las sPPasas Familia I presentan una alta similitud. La estructura más estudiada ha sido la de la sPPasa de *E. coli*. En este caso cada monómero está compuesto por 175 aminoácidos estructurados en dos α -hélices y nueve hojas β , algunas de las cuales forman una estructura de barril β . La conformación espacial de la proteína deja una cavidad superficial que corresponde al sitio activo de la enzima. Uno de los extremos de una de las α -hélices forma parte del sitio activo mientras que el otro está implicado en las interacciones con los otros monómeros para formar el hexámero (Salminen, Kapyla et al. 1995).



Figura 1.2: Alineamiento de secuencias de diferentes sPPasas Familia I. En color amarillo se muestra el dominio PROSITE (DXDPXD) característico de las sPPasas Familia I y con asteriscos se muestran los residuos conservados.

La unión de PPi al sitio activo de la enzima para llevar a cabo la catálisis, es un proceso complejo dependiente de iones metálicos divalentes (Zyryanov, Shestakov et al. 2002). Siendo el más efectivo, para las sPPasas Familia I, el Mg^{2+} . *In vitro*, la catálisis más eficiente se ha obtenido a pH alcalino (pH entre 8-9) cuando, además de PPi, en el

sitio activo se han unido tres o cuatro iones metálicos. Durante este proceso, en primer lugar se asocian dos iones metálicos en las posiciones I y II, a continuación se une un tercer ión metálico en la posición III proveniente del sustrato ($Mg^{2+}\cdot PPI$). La asociación del cuarto ión metálico en la posición IV se produce simultáneamente a la unión al sitio activo de los productos de hidrólisis. La dependencia de los iones metálicos se debe a que proporcionan la conformación necesaria para la unión del sustrato al sitio activo; además, al interactuar con los grupos fosfato, incrementan la electrofilia de los átomos de fósforo, esencial para una hidrólisis eficiente, lo que se traduce en una disminución del pKa y en una estabilización del estado de transición.

Además de PPI, las sPPasas Familia I pueden hidrolizar otros sustratos similares como ATP o polifosfatos. En 2002, Zyryanov determinó varios parámetros cinéticos para Ipp1p en presencia de tres sustratos diferentes: PPI, ATP y trifosfato (P_3). *In vitro*, la catálisis más eficiente se obtuvo con PPI como sustrato y Mg^{2+} como cofactor. Curiosamente la constante catalítica (k_{cat}) aumentó para los sustratos ATP y P_3 cuando se utilizaron como cofactores cationes divalentes distintos al Mg^{2+} (Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+}) (Zyryanov, Shestakov et al. 2002).

En contraste al efecto del Mg^{2+} , se ha demostrado una fuerte inhibición por Ca^{2+} a concentraciones fisiológicas muy bajas en sPPasas de Familia I (Yang and Wensel 1992). Se ha estudiado el mecanismo de inhibición en la sPPasa de *E. coli* sugiriendo como posibles razones del efecto inhibitorio, la incompatibilidad catalítica debido a la sustitución de Mg^{2+} por Ca^{2+} en la posición II del sitio activo, así como la competencia con $Mg^{2+}\cdot PPI$ del compuesto no hidrolizable $Ca^{2+}\cdot PPI$ (Samygina, Popov et al. 2001).

Se ha descrito recientemente una sPPasa Familia I particular, la sPPasa mitocondrial del protozoo parásito *Leishmania major* (Gomez-Garcia, Ruiz-Perez et al. 2004), una proteína de 263 aminoácidos y una masa molecular de 29 kDa. La peculiaridad de esta sPPasa Familia I reside en su activación catalítica por Ca^{2+} . Aunque no está demostrado, parece que es debido a una sustitución en su secuencia del residuo Arg78 (posición en la secuencia de la sPPasa de levaduras), conservado en todas las sPPasas, por un residuo de Gly.

1.4.1.2 Pirofosfatasas solubles Familia II

Esta Familia Incluye las sPPasas de *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* y otras estirpes bacterianas Gram positivas, así como de algunas arqueas. En ningún caso presentan similitud ni en secuencia ni en estructura respecto a las sPPasas Familia I, aunque la conformación espacial del sitio activo, así como el mecanismo catalítico son análogos en ambos casos (Gomez Garcia, Poort et al. 2001). Las sPPasas Familia II son proteínas con dominios DHH-DHHA2 (código Pfam PF02833) que presentan similitud con algunas exopolifosfatasas (Shintani, Uchiumi et al. 1998).

La sPPasa de *S. mutans* es un homodímero, cada monómero tiene una masa molecular de 33,4 kDa y consta de 309 aminoácidos que pueden dividirse en dos regiones: un dominio *N*-terminal que comprende los aminoácidos 1-189, y un dominio *C*-terminal correspondiente a los aminoácidos 196-309. Ambas regiones están conectadas por un lazo de 6 residuos. El dominio *N*-terminal se estructura en cinco hojas β y siete α -hélices y el *C*-terminal está compuesto por cinco hojas β (Merckel, Fabrichniy et al. 2001).

Las propiedades de las dos familias también difieren sustancialmente. Las sPPasas Familia II son 20-50 veces más eficientes en el proceso catalítico y presentan diferentes especificidades por sustrato y cofactor metálico. A diferencia de las sPPasas Familia I, las sPPasas Familia II no son capaces de hidrolizar ATP y otros polifosfatos, presentan mayor eficiencia catalítica con Mn^{2+} o Co^{2+} como cofactor en lugar de Mg^{2+} , y no son inhibidas por Ca^{2+} (Zyryanov, Tammenkoski et al. 2004).

La sPPasa de *B. subtilis* se activa con Mn^{+2} y Co^{+2} , pero no con Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} o Ni^{2+} , siendo el Mn^{+2} , al igual que para el resto de sPPasas Familia II, su cofactor más eficiente. Es un homodímero y su tamaño es de 309 aminoácidos por subunidad de forma que recuerda más bien a las sPPasas de organismos eucariotas (Young, Kuhn et al. 1998).

La conservación de la disposición espacial del sitio activo en ambas familias de sPPasas, pese a la alta divergencia respecto a la estructura proteica y el resto de la secuencia, hacen que las sPPasas sean consideradas un ejemplo de evolución convergente consecuencia del proceso de sustitución funcional de las sPPasas

arquetípicas ancestrales ocurrido en la evolución de algunos procariotas (Gomez-Garcia and Serrano 2002).

1.4.2 Pirofosfatasa de membrana translocadora de protones

Diversos estudios han demostrado que ciertos organismos como plantas, bacterias y diversos protistas pueden utilizar PPI en lugar del ATP. En estos organismos se han encontrado pirofosfatasa de membrana translocadora de protones (H^+ -PPasas) capaces de aprovechar la energía de enlace del PPI para la bioenergética celular (Rea and Poole 1985; Baltscheffsky, Schultz et al. 1999). Las H^+ -PPasas acoplan la energía de hidrólisis de PPI al movimiento de protones a través de las membranas biológicas. Generando así un gradiente electroquímico que puede acoplarse a distintos procesos de transporte secundario, como el transporte de diversos iones al interior de la vacuola, de tal forma que funcionan de manera análoga a las H^+ -ATPasas (Maeshima 2000; Drozdowicz and Rea 2001; Serrano, Perez-Castineira et al. 2007).

Las H^+ -PPasas se localizan en las membranas de las vesículas y acidocalcisomas de los procariotas y en la membrana de distintos orgánulos acidificados (acidocalcisomas, lisosomas, vacuolas) de algunos eucariotas: diversos protistas, algas y plantas superiores (Maeshima 2000; Perez-Castineira, Gomez-Garcia et al. 2001; Perez-Castineira, Lopez-Marques et al. 2001; Docampo, de Souza et al. 2005).

La primera H^+ -PPasas se describió por primera vez a mediados de los años 60 en los cromatóforos de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky 1967). Una década más tarde se publicó la presencia de estas proteínas en plantas, y a partir de los años 90 se han obtenido secuencias que codifican H^+ -PPasas de membranas internas de plantas, protistas tanto fotosintéticos como no fotosintéticos, bacterias y arqueas, y más recientemente, en huevos y ovarios del insecto *Rhodnius prolixus* (Baltscheffsky, Schultz et al. 1999; Maeshima 2000; Perez-Castineira, Gomez-Garcia et al. 2001; McIntosh and Vaidya 2002; Perez-Castineira, Alvar et al. 2002; Motta, da Silva et al. 2004). Actualmente, existen en bases de datos más de 1700 secuencias que codifican para posibles PPasas de membrana. Es interesante hacer notar que se han conservado en el linaje evolutivo fotosintético (exceptuando las cianobacterias), pero hasta el momento no se han encontrado en membranas de células animales (a excepción

del artrópodo *Rhodnius prolixus*) o de hongos, aunque sí en sus protistas parásitos. La presencia o ausencia de los distintos tipos de PPasas en diferentes organismos así como su localización subcelular en células eucarióticas presentan aún muchos puntos por esclarecer. Como consecuencia de ello, aspectos claves como la implicación de las PPasas en respuestas a estrés, su regulación tanto a nivel génico como posttraduccional, y la posible interacción con otras proteínas están por determinar.

Las H⁺-PPasas son proteínas muy hidrofóbicas que tienen un tamaño por subunidad de 71-80 kDa, poseen alrededor de 16 segmentos transmembranas y varios bucles citoplasmáticos en los que se encuentran los motivos funcionales y de anclaje al sustrato (Baltscheffsky, Schultz et al. 1999; Maeshima 2000; Drozdowicz and Rea 2001). La clonación de los genes de las H⁺-PPasas de *Arabidopsis thaliana* y otras plantas, así como la expresión heteróloga de éstas, han demostrado que estas proteínas son las bombas de protón primarias más simples que se conocen (Sarafian, Kim et al. 1992; Kim, Zhen et al. 1994; Maeshima 2000).

Hasta la fecha, se han caracterizado dos clases bioquímicamente diferentes de H⁺-PPasas: aquéllas cuya actividad es dependiente de K⁺ (tipo I) y otras que son independientes de este catión (tipo II). Inicialmente se pensó que las dependientes de potasio eran características de plantas y las independientes de bacterias fotosintéticas (Baltscheffsky, Schultz et al. 1999; Maeshima 2000). Sin embargo, se ha demostrado la existencia de una H⁺-PPasa “tipo procariótica” en *A. thaliana* (Drozdowicz and Rea 2001), así como una H⁺-PPasa “tipo planta” en la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima* (Perez-Castineira, Lopez-Marques et al. 2001) y evidencias análogas a las anteriores que demuestran que ambos tipos de H⁺-PPasas están ampliamente distribuidas entre los distintos organismos.

Las H⁺-PPasas suelen colocalizar con las H⁺-ATPasas en aquellos eucariotas que poseen ambas proteínas (Schumacher 2006). Esta última, desarrolla un papel esencial en la generación de un gradiente de protones hacia el interior de las vacuolas, utilizando la energía de hidrólisis del ATP (Forgac 2007). Esta coexistencia plantea un interrogante sobre el significado fisiológico de esta redundancia funcional. El tonoplasto de células vegetales es uno de los escenarios en los que colocalizan H⁺-ATPasas (V-ATPasas) y H⁺-PPasas (V-PPasas). Se ha demostrado que el gradiente de protones producido por la V-PPasa es de igual

magnitud o incluso mayor que el producido por la V-ATPasa. Ambas contribuyen a generar la acidificación del compartimento vacuolar y en la mayor parte de los casos, el gradiente de pH producido por ellas no es aditivo (Rea 1993). En frutos de *Vitis vinifera*, sin embargo, la acidificación de la vacuola por la acción simultánea de ambas bombas de protones es mayor que la producida por cada una de ellas por separado (Terrier 1998). En general, no parece existir ningún tipo de interacción directa entre las dos bombas de protones vacuolares. Sin embargo, la V-PPasa podría estar implicada en la inactivación de la actividad de transporte de H^+ de la V-ATPasa, como han mostrado los resultados obtenidos del aislamiento de vesículas del tonoplasto de hojas de *Kalanchoe daigremontiana* (Marquardt-Jarczyk 1990) y *K. blossfeldiana* (Fischer-Schliebs, Ball et al. 1997). En *K. blossfeldiana* observaron que el transporte de protones por parte de la V-ATPasa en membranas vacuolares aisladas de esta planta era estimulado cuando dichas vesículas era pre-energetizadas mediante la actividad de una V-PPasa. Este efecto no era recíproco. De este modo, los autores propusieron que la V-PPasa modula la acción de la V-ATPasa, posiblemente mediante la interacción entre la H^+ -PPasa y la subunidad A de la H^+ -ATPasa. Una función atribuida a la V-PPasa podría ser el transporte de H^+ hacia el interior de la vacuola bajo condiciones en la que la concentración de ATP citosólica, y no la de PPi, sea limitante. Estas condiciones podrían ser la existencia de bajas temperaturas, anoxia o condiciones de estrés salino, prueba de ello, es que su sobreexpresión puede provocar una tolerancia mayor a la sequía y a la sal (Carystinos, MacDonald et al. 1995).

1.5 Las pirofosfatasas en organismos eucariotas

1.5.1 Las pirofosfatasas en eucariotas fotosintéticos

La principal diferencia con los organismos eucariotas no fotosintéticos, es que en las células fotosintéticas, las sPPasas parecen estar limitadas al lumen mitocondrial y de los plástidos (Weiner 1987) (Gómez-García Tesis doctoral) (Figura 1.3). De este modo, en estas células, las H^+ -PPasas junto a otras enzimas citosólicas que utilizan PPi, como la UDP-glucosa pirofosforilasa, serían las encargadas de mantener los niveles de PPi en el citosol (Rea, Britten et al. 1992). Estas últimas parecen ser ubicuas en plantas superiores ya que se han descrito, hasta el momento, actividades de bombeo de protones

asociadas a hidrólisis de PPi en membranas internas de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, C3, C4 ó CAM. Su localización en tejidos y órganos es también universal, encontrándose en hojas, raíces, cotiledones, coleoptilos, hipocotilos, plántulas, el tejido de la aleurona, inflorescencias, frutos, polen y el floema (Karlsson 1975; Chanson, Fichmann et al. 1985; Maeshima and Yoshida 1989; Swanson and Jones 1996; Smart, Vojdani et al. 1998; Suzuki, Kanayama et al. 1999; Mitsuda, Enami et al. 2001; Terrier, Sauvage et al. 2001; Wang, Luttge et al. 2001). También se han descrito en algas y microalgas, como *Acetabularia acetabulum*, *Chara corallina*, *Chlamydomonas reinhardtii* o *Chlorococcum littorale* (Nakanishi, Matsuda et al. 1999).

Las pirofosfatasa de organismos fotosintéticos más estudiadas son las de plantas superiores, concretamente las de la planta modelo *A.thaliana*. En el genoma de esta planta existen seis genes que codifican para sPPasas (ATPPA 1-6) y tres genes que lo hacen para H⁺-PPasas: AVP1, isoforma tipo I de localización vacuolar, AVP2, isoforma tipo II localizada en el sistema Golgi, y AVP3, isoforma tipo II minoritaria aún no caracterizada. Aunque se ha determinado la presencia de sPPasas en plantas superiores, sólo algunas de estas enzimas están bien caracterizadas en *A.thaliana*. Mediante análisis de secuencia, se ha determinado que todas las sPPasas de *A.thaliana* pertenecen a la Familia I. Curiosamente, la sPPasa codificada por el gen *ATPPA6*, cuyo producto presenta localización cloroplástica, posee una alta similitud de secuencia con la sPPasa de *S. cerevisiae*, considerándose una sPPasa de origen eucariota. Por el contrario, el resto de sPPasas son de localización indeterminada aún y están relacionadas filogenéticamente con la sPPasa de *E.coli*, considerándose sPPasas de origen procariota.

Uno de los organismos eucariotas fotosintéticos cuyas sPPasas han sido caracterizadas es *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta alga verde posee dos sPPasas Familia I, Cr-sPPasa I y Cr-sPPasa II, localizadas en el cloroplasto y la mitocondria respectivamente. Ambas sPPasas presentan diferencias en cuanto a las relaciones filogenéticas, de manera que Cr-sPPasa I es una sPPasa de origen eucariota, mientras que Cr-sPPasa II se considera de origen procariota. Respecto a la estructura proteica, ambas se caracterizan por ser sPPasas Familia I monoméricas (Gomez-Garcia, Losada et al. 2006).

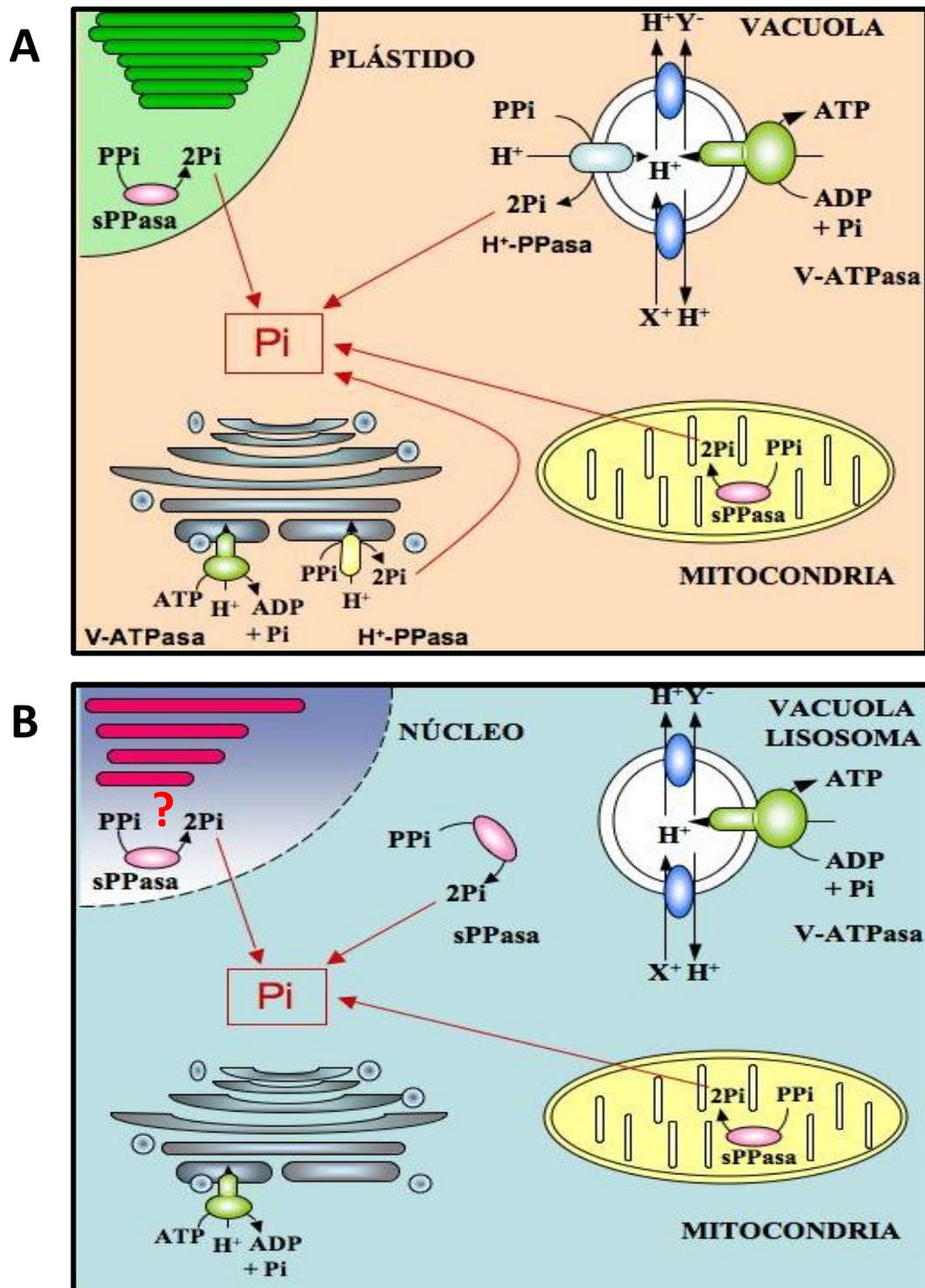


Figura 1.3: Representación esquemática del escenario metabólico relacionado con las PPasas que aparecen en distintos compartimentos celulares en células eucariotas fotosintéticas (A) y en células fúngicas o animales (B) y sus relaciones con la reserva de Pi citosólica. Ambos tipos de células poseen sPPasas en diferentes orgánulos (mitocondrias y cloroplastos en caso de células fotosintéticas). Las células de microalgas y meristemáticas de plantas (A) carecen de sPPasa citosólica. Esta función la realizan H^+ -PPasas vacuolares y en algunos organismos, de aparato de Golgi. En estos casos, la hidrólisis de PPI se acopla a la generación de un gradiente electroquímico de protones. Las células fúngicas y de animales (B) carecen de H^+ -PPasas, y la hidrólisis del PPI citosólico se realiza mediante sPPasas. La localización de una sPPasa en el compartimento nuclear no está aún clarificada.

Existen también diferencias, entre eucariotas fotosintéticos y no fotosintéticos, respecto al contenido citosólico de PPI, que en tejidos fotosintéticos se mantienen a nivel milimolar (2-20 mM), mucho mayor que en levaduras donde los niveles son μmolares (2-20 μM). Estos datos hacen pensar que, aunque existan un gran número de genes de sPPasas en plantas, estas se restringen a los orgánulos exclusivamente. Además de en mitocondrias y cloroplastos, es posible que estas sPPasas también se compartimentalicen en el núcleo ya que se han encontrado indicios de la presencia de una sPPasa en este compartimento mediante un análisis de proteómica masiva nuclear de células de *Oryza sativa* (Choudhary, Basu et al. 2009).

1.5.2 Pirofosfatasa en hongos y metazoos

La principal característica de hongos y metazoos, en relación con las pirofosfatasa, es la ausencia en su genoma de genes que codifiquen H⁺-PPasas (Figura 1.3). La levadura *S. cerevisiae* es el eucariota no fotosintético más estudiado en relación al metabolismo del PPI. Este organismo tiene en total dos genes que codifican dos sPPasas diferentes. El gen de copia única *IPP1*, localizado en el cromosoma II, codifica para la sPPasa citosólica de la levadura, proteína constitutiva y altamente expresada (Kolakowski, O'Neill et al. 1998). Lundin et al. (Lundin, Deopujari et al. 1992) describieron otro gen localizado en el cromosoma XIII denominado *IPP2*, el cual codifica una sPPasa mitocondrial. Esta última proteína posee un péptido de tránsito e interacciona de manera no-covalente con la membrana interna mitocondrial. En cuanto a secuencia, ambas proteínas tienen un 49% de homología. La principal diferencia, a nivel de proteína, es que *Ipp2p* presenta específicamente una secuencia de 30 aminoácidos rica en residuos básicos en el extremo *N*-terminal correspondiente al péptido de tránsito, lo que es común entre las proteínas mitocondriales.

Respecto a la estructura, ambas forman un homodímero típico de las sPPasas Familia I de origen eucariota; sólo existe una ligera diferencia en tamaño, siendo el monómero de *IPP1* de 32 kDa, mientras que el de *IPP2* es de 35 kDa. Otra diferencia entra ambas sPPasas es el fenotipo presentado por los mutantes defectivos en uno u otro gen. La proteína *Ipp1p* es esencial para el crecimiento de la célula (Perez-Castineira, Lopez-Marques et al. 2002). Por el contrario, la depleción de *IPP2* es viable, excepto cuando la levadura depende estrictamente de metabolismo respiratorio. El fenotipo de

los mutantes *IPP2Δ* es similar al de los mutantes *petite* y, al igual que ellos, carecen de DNA mitocondrial (Lundinsb, Baltscheffskys et al. 1991), lo que indica que Ipp2p es esencial para el mantenimiento del genoma mitocondrial.

Tras haberse completado el genoma de *S. cerevisiae* no se ha encontrado ningún otro gen que codifique este tipo de proteínas solubles ni tampoco ninguno que codifique H⁺-PPasas. Estudios previos han sugerido la presencia de actividad pirofosfatasa en el núcleo de la levadura (Lichko, Kulakovskaya et al. 2003) y que dicha actividad se encuentra asociada a una proteína de 41 kDa. Este mismo grupo publicó anteriormente la existencia de varias pirofosfatasas en diferentes compartimentos celulares: citosol (71 kDa), mitocondria (185 y 58 kDa) y vacuolas (120 y 82 kDa) (Kasho and Avaeva 1978; Lichko and Okorokov 1991; Lichko, Kulakovskaya et al. 1997). Todas estas informaciones son contradictorias con la que ofrece el proyecto genoma de este organismo, ya que la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* sólo muestra la presencia de las sPPasas codificadas por *IPP1* con una masa molecular de 32,3 kDa, y por *IPP2*, la enzima mitocondrial, de 35,6 kDa.

En el caso de humanos, también existen dos sPPasas Familia I: una de localización mitocondrial, PPA2, y otra localizada en el citosol, PPA1. En el caso de *Drosophila melanogaster*, se ha descrito una sPPasa, NURF38, formando parte del factor de remodelación del nucleosoma, NURF (Gdula, Sandaltzopoulos et al. 1998). En este estudio se determinó, mediante análisis de secuencia, el motivo PROSITE que define a la sPPasa arquetípica así como la presencia de los 13 aminoácidos conservados que forman parte del sitio activo. Además se determinó la actividad pirofosfatasa, resultando del mismo orden que la de Ipp1p ($\sim 1.13 \times 10^{-4}$ mol Pi/mg proteína/min), la cual se puede desacoplar de la actividad remodeladora de la cromatina del complejo NURF. Se ha sugerido que la presencia de NURF38 en el complejo se deba a que intervenga en la eliminación del PPi generado en la replicación y transcripción del DNA, o bien que tenga un papel estructural o regulador en el complejo NURF, aunque no hay nada demostrado hasta la fecha.

1.6 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota

Además de la larga trayectoria en las industrias alimentaria y biotecnológica, la levadura *S. cerevisiae* es el organismo modelo más ampliamente utilizado (Botstein and

Fink 2011) y, como sistema celular eucariota, tiene numerosas ventajas sobre otros tipos de modelos celulares:

- Es un organismo unicelular no patógeno de rápida adaptación y fácil crecimiento bajo numerosas condiciones.
- *S. cerevisiae* presenta un ciclo biológico con dos fases biológicas estables: haploide y diploide. La fase haploide permite generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad, mientras que en la fase diploide se pueden realizar una amplia variedad de análisis genéticos.
- Existe una amplia gama de herramientas moleculares que hacen muy sencilla su manipulación genética.
- Otra ventaja que presenta *S. cerevisiae* es la alta tasa de recombinación homóloga que permite la integración de ADN transformante en una localización exacta del cromosoma, reemplazando por tanto el gen deseado por un marcador de selección, por un alelo mutante, o introduciendo promotores regulables o etiquetas moleculares (GFP, 3HA, Myc, etc). Gracias al marcaje con etiquetas moleculares se puede examinar fácilmente la localización intracelular de las proteínas y detectar sus niveles de expresión.
- La mayor parte de los procesos celulares básicos están altamente conservados desde la levadura hasta el ser humano, especialmente los relacionados con el metabolismo y la división celular.
- *S. cerevisiae* es probablemente el organismo eucariótico mejor conocido y del que existen un mayor número de bases de datos disponibles que albergan información acerca de su genoma, transcriptoma, proteoma o interactoma.

El uso de la levadura como modelo eucariota ha establecido nuevos campos de estudio en biología en lo que se va más allá del estudio individual de la función de genes y proteínas y que se centra en las relaciones entre ellos, como son la genómica funcional o la biología de sistemas (Botstein and Fink 2011). En los últimos años, la levadura está siendo utilizada en la producción de proteínas recombinantes, por su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales de tipo eucariota, unas modificaciones que no pueden realizar las bacterias.

Más reciente es el uso de la levadura humanizada, que consiste en el reemplazamiento de genes propios de la levadura por sus ortólogos humanos y que

permite el estudio de la estructura y función de los mismos en un ambiente celular ordenado (Osborn and Miller 2007; Greenwood and Ludovico 2010; Silva, Manon et al. 2011). Dada la alta similitud entre los procesos de muerte celular programada o apoptosis mitocondrial de metazoos y la apoptosis de levaduras, éste se ha convertido en uno de los procesos celulares más estudiados utilizando levaduras humanizadas (Greenwood and Ludovico 2010; Khurana and Lindquist 2010).

Es frecuente la utilización de la levadura como organismo modelo en el análisis del metabolismo celular eucariota. Algunos estudios realizados para tal efecto son por ejemplo: el uso de *S. cerevisiae* como modelo eucariota para investigar la regulación del metabolismo de fosfolípidos de humanos (Henry and Patton-Vogt 1998; Santos and Riezman 2012), o el metabolismo de hierro y cobre en mamíferos y plantas (De Freitas, Wintz et al. 2003). Varios de estos estudios también están dirigidos hacia la investigación de enfermedades humanas, como por ejemplo el uso de la levadura como modelo para analizar la base molecular de la esclerosis lateral amiotrófica (Bastow, Gourlay et al. 2011) o el cáncer (Pereira, Coutinho et al. 2012).

1.6.1 Metabolismo celular

El metabolismo del carbono es muy importante en levaduras, ya que los azúcares suponen la principal fuente de energía para estos organismos. Dependiendo de las condiciones ambientales y, en particular, de la naturaleza de la fuente de carbono, *S. cerevisiae* ajusta su metabolismo energético, en un proceso conocido como “represión catabólica del carbono” (Fendt and Sauer 2010). Existen dos casos extremos, crecimiento en glucosa o en glicerol, que conducen hacia una fermentación exclusiva con producción de etanol y glicerol o hacia un metabolismo exclusivamente respiratorio con producción de dióxido de carbono, respectivamente. En ambos casos, la producción de energía está mediada por la activación diferencial de factores de transcripción. Durante el metabolismo fermentativo se reprime la expresión de genes implicados en la respiración y gluconeogénesis, y se minimiza la actividad del ciclo del ácido tricarbónico. Durante el crecimiento respiratorio, por el contrario, los genes implicados en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria se encuentran altamente inducidos (Schuller 2003). Además de estos dos casos extremos, la levadura puede utilizar otras fuentes de carbono, como la galactosa. La utilización de este azúcar en

levaduras se realiza mediante la vía Leloir, en la que la galactosa es convertida en glucosa-1-P a través de galactosa-1-P. La expresión de los genes que codifican para enzimas de la vía Leloir están fuertemente regulados, reprimiéndose por glucosa y activándose (hasta 1.000 veces) por galactosa. Al igual que ocurre con glucosa, el crecimiento en galactosa conduce hacia una fermentación exclusiva con producción de etanol y glicerol (Bro, Knudsen et al. 2005).

Cuando la levadura se cultiva en glucosa y con disponibilidad de oxígeno, sufre lo que se conoce como crecimiento diáuxico, en el que se pueden diferenciar dos etapas de crecimiento. En una primera fase, hasta aproximadamente $O.D._{600} = 1$, la levadura consume la glucosa mediante fermentación produciendo etanol y glicerol. En la segunda fase, una vez agotada la glucosa, el etanol y glicerol producidos en la etapa anterior son consumidos mediante respiración (Postma, Verduyn et al. 1989).

En el caso de metazoos, las células normalmente obtienen la energía a través de una baja tasa de glucólisis seguida de una oxidación del piruvato hasta dióxido de carbono mediante respiración mitocondrial. El efecto Warburg, se describió en 1931 por Otto Warburg como una característica que presentaban algunas células humanas en las que observó un intenso y rápido proceso de glicólisis anaerobia seguida de una fermentación láctica en presencia de oxígeno. En los últimos años, se considera una de las características que debe obtener una célula en su progresión maligna (Warburg 1959). La existencia de estas similitudes entre el metabolismo del carbono en células tumorales y levaduras con metabolismo fermentativo, ha llevado recientemente a proponer a la “levadura tumorizada” como modelo para la selección de fármacos contra el cáncer y para estudios de metabolismo con el fin de determinar alteraciones metabólicas en cáncer (Diaz-Ruiz, Rigoulet et al. 2011).

Como en otras ocasiones, la levadura ha contribuido como organismo modelo en la investigación de mecanismos de regulación metabólica, en muchos casos conservados en todos los eucariotas. La regulación en estos organismos puede ocurrir a varios niveles: síntesis o degradación de enzimas, actividad enzimática, compartimentación celular o mecanismos de transporte. La renovación de proteínas es un mecanismo de regulación muy importante de la función celular en todos los eucariotas que afecta directamente a numerosas funciones, incluyendo el ciclo celular, la regulación de la expresión génica y el metabolismo o las respuestas al estrés oxidativo (Glotzer,

Murray et al. 1991; Brown and Goldstein 1997). La proteólisis es un proceso específico en el que las proteínas se hidrolizan en sus aminoácidos constituyentes; éstos se utilizan posteriormente para la síntesis de nuevas proteínas. En las células eucariotas existen dos mecanismos altamente conservados de degradación de proteínas: proteólisis en compartimentos ácidos (lisosomas en metazoos y vacuola en levaduras) y degradación vía proteasoma (Lecker, Goldberg et al. 2006).

Los lisosomas y vacuolas son compartimentos de membrana cerrados que contienen una gran variedad de enzimas digestivas, incluyendo proteasas. La proteólisis por inclusión en compartimentos ácidos suele ser un proceso lento no selectivo, por lo que la mayoría de proteínas degradadas por esta vía suelen tener una larga vida media (Baehrecke 2005). Sin embargo, en algunos casos los lisosomas pueden degradar proteínas de manera selectiva como respuesta a condiciones de hambre de algún nutriente, fundamentalmente carbono o nitrógeno. Las proteínas degradadas de manera selectiva en lisosomas contienen una secuencia consenso (KFERQ) que probablemente las dirija a dichos compartimentos ácidos (Dice 1988). En condiciones de hambre celular, estas proteínas son sacrificadas para proporcionar aminoácidos y energía, permitiendo que procesos metabólicos básicos puedan continuar.

La degradación vía proteasoma, a diferencia de la proteólisis en compartimentos ácidos, es un proceso rápido y altamente selectivo, siendo la mayoría de las proteínas degradadas por esta vía, proteínas de vida media corta. El proteasoma es un complejo multiproteico formado por dos subcomplejos de distinta funcionalidad denominados 19S y 20S, según su coeficiente de sedimentación en centrifugación en gradiente de densidad. El núcleo catalítico con actividad proteasa es 20S, su masa molecular aproximada es de 750 kDa y presenta forma cilíndrica. El subcomplejo regulador es el 19S, con una masa aproximada de 700 kDa. El subcomplejo 20S se une por sus extremos a uno o dos subcomplejos 19S, formando el proteasoma 26S (Tanaka 2009). La vía proteasómica utiliza normalmente el marcaje de la proteína con ubiquitinas, proteínas de 76 aminoácidos altamente conservada en eucariotas. La ubiquitinación es una modificación post-traducciona que consiste en la unión por un enlace covalente de una o varias moléculas de ubiquitina a una proteína sustrato. Este proceso es llevado a cabo específicamente por un sistema enzimático de tres componentes (E1: activa la ubiquitina mediante gasto energético de ATP, E2: conjuga la ubiquitina temporalmente y E3: ubiquitina ligasa; toma la ubiquitina de E2 y la liga a la proteína sustrato), y puede

ser revertido por otro grupo de enzimas, las deubiquitinasas (DUBs) (Jonkers and Rep 2009). Los proteasomas en células eucariotas pueden localizarse en citosol y en núcleo. Los mecanismos que median en la distribución dinámica de éstos se desconocen, aunque se han encontrado señales de localización nuclear en algunas subunidades proteasomales, y se ha visto que en algunos casos el estado de fosforilación de ciertas subunidades del proteasoma media en su localización núcleo-citoplásmica (Konstantinova, Tsimokha et al. 2008).

1.6.2 Muerte y ciclo celular

El ciclo celular regula la proliferación. La alta similitud de este proceso y de sus mecanismos de regulación en levaduras y metazoos hace que sea uno de los procesos en el que más se ha utilizado a la levadura como modelo eucariota. En las células eucariotas, el ciclo celular se divide en una serie de etapas por las que cronológicamente va pasando la célula. Básicamente el ciclo celular se divide en dos etapas funcionales: fase M o de mitosis y fase S o de síntesis del DNA; y dos etapas preparatorias: G₁ y G₂. La mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente (Lundberg and Weinberg 1999). Hay células que cesan por completo su división en condiciones subóptimas de crecimiento y otras que sólo se dividen ocasionalmente, cuando es necesario reemplazar la pérdida de células por lesión o muerte celular. Estas condiciones, en las que las células permanecen durante un tiempo, que puede ser indefinido, en estado de reposo o quiescente, se denomina G₀. Este estado se caracteriza por la desaparición de la maquinaria de regulación del proceso (Luo, Talarek et al. 2011).

Para lograr coordinar y regular al ciclo celular, tanto espacial como temporalmente, existen puntos de control que previenen la entrada a una nueva fase mientras no se encuentre concluida la anterior (Ivanchuk and Rutka 2004). Estos puntos de control se basan en un intrincado sistema de fosforilación/desfosforilación de proteínas que determinan y regulan la actividad, asociación, localización celular y degradación de otras proteínas. Las principales responsables de la coordinación de esta serie de eventos son un grupo de quinasas que conforman una familia denominada quinasas dependientes de ciclinas o CDKs. Estas CDKs fosforilan proteínas en residuos Serina o Treonina que preceden a un residuo Prolina (motivos Ser/Thr-Pro). La actividad de las enzimas CDK, y por lo tanto los puntos de control que regulan, es

controlada por múltiples mecanismos. Las CDKs en forma monomérica son inactivas y la unión a una subunidad activadora, una ciclina, es requisito previo para su actividad quinasa. Por lo tanto, la expresión cíclica y la degradación de las ciclinas determina y restringe la actividad de cada CDK a una ventana reducida de tiempo durante el ciclo celular. Otro nivel de control es ejercido por la fosforilación, que puede activar o inhibir la actividad de las CDK. Finalmente otro nivel de regulación es ejercido por las subunidades inhibitorias de CDK (CKI), como p27 y p21, que se unen a las CDKs.

En levaduras, una sola CDK interactúa con diferentes ciclinas en diferentes momentos a lo largo del ciclo celular (Moser and Russell 2000), mientras que en células de mamíferos, múltiples CDKs interactúan con algunas ciclinas en un patrón secuencial complejo (Morgan 1997) (Tabla I).

Tabla I: Algunas ciclinas implicadas en la regulación del ciclo celular de vertebrados y levaduras

Fase del ciclo celular	Vertebrados		<i>S. cerevisiae</i>	
	ciclina	CDK asociada	ciclina	CDK asociada
G1	ciclina D	Cdk4,6	<i>CLN3</i>	<i>CDC28</i>
G1/S	ciclina E	Cdk2	<i>CLN1,2</i>	
S	ciclina A	Cdk2	<i>CLB5,6</i>	
M	ciclina B	Cdk1	<i>CLB1,2,3,4</i>	

Otros procesos frecuentemente estudiados en la levadura como célula modelo eucariotas son los tipos de muerte celular, ya que son mecanismos altamente conservados a lo largo de la evolución. El uso de levaduras humanizadas para el estudio de la apoptosis se inició hace varios años cuando se comprobó que los principales reguladores de la apoptosis mantenían sus funciones pro- y anti-apoptóticas cuando se expresaban en levaduras (Manon, Chaudhuri et al. 1997). Actualmente se utilizan frecuentemente como medio de identificación y caracterización de nuevos reguladores apoptóticos (Hotchkiss, Strasser et al. 2009; Orrenius, Nicotera et al. 2011; Portt, Norman et al. 2011; Galluzzi, Vitale et al. 2012).

En base a aspectos morfológicos, se pueden diferenciar dos tipos de muerte celular: la apoptosis y la necrosis. El término apoptosis fue acuñado por primera vez por Kerr et al, en 1972. Se trata de un tipo de muerte celular programada en la que los rasgos característicos son: la generación masiva de radicales libres de oxígeno (ROS), la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática, la aparición de cuerpos apoptóticos en células cuyo contenido ha sido degradado, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la degradación del ADN (Kerr, Wyllie et al. 1972). Este proceso es de vital importancia para el desarrollo y la supervivencia de los organismos y se basa principalmente en la activación controlada de proteasas (caspasas) e hidrolasas que degradan ciertos componentes celulares (Vicencio, Galluzzi et al. 2008). La apoptosis es una respuesta extrema al estrés celular que acaba en la muerte de las células dañadas y representa un importante mecanismo de supresión tumoral. De hecho, fallos en los mecanismos celulares de apoptosis son responsables de la aparición y progresión de algunos tipos de cáncer (Zivny, Klener et al. 2010). En mamíferos existen dos vías que inducen el programa apoptótico: la vía extrínseca se activa en su mayor parte por la percepción de señales extracelulares a través de receptores superficiales, como el factor de necrosis tumoral (TNF α), uno de los receptores más estudiados. Por el contrario, la vía intrínseca o mitocondrial se activa por diversos estreses, químicos, agentes físicos (alta osmolaridad, cambios de pH o temperatura), y estreses intracelulares como daños en el DNA o la acumulación de proteínas mal plegadas (Carmona-Gutierrez, Eisenberg et al. 2010; Orrenius, Nicotera et al. 2011). Estos estreses conducen a la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial permitiendo la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo c. La apoptosis en levaduras ha sido considerada como un mecanismo de adaptación frente a las condiciones ambientales adversas y fue descrita por primera vez en un mutante *cdc48* (Madeo, Frohlich et al. 1997). Los fenotipos observados en la cepa *cdc48* eran características propias de la apoptosis en mamíferos como la fragmentación del ADN, la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática y la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como papel central en el proceso de apoptosis en levaduras confirmó que la similitud de este proceso con la apoptosis en mamíferos no se reducía únicamente a características morfológicas (Madeo, Frohlich et al. 1999).

La necrosis, es un tipo de muerte celular que se produce como respuesta a un estrés catastrófico que conduce a una lesión celular perjudicial e irreversible (Weinlich, Dillon et al. 2011). Es un proceso caracterizado morfológicamente por la vacuolización del citoplasma, la ruptura de la membrana plasmática y la inducción de una respuesta inflamatoria alrededor de la célula que está muriendo (Proskuryakov, Gabai et al. 2002). Tradicionalmente se ha considerado la necrosis como un proceso pasivo e independiente del consumo de energía. Sin embargo, en la última década se han realizado estudios que demuestran que la muerte necrótica también está regulada (Leist and Jaattela 2001). Recientemente se ha descrito una variedad de necrosis, necroptosis, que se induce por estreses severos como algunas formas de daño en el DNA (Weinlich, Dillon et al. 2011; Wu, Liu et al. 2012).

Además de los dos sistemas de muerte celular descritos anteriormente, algunos autores consideran la autofagia un proceso de muerte celular, mientras que otros la consideran un mecanismo de defensa frente a diferentes estreses (Denton, Nicolson et al. 2012). Existen varios tipos de autofagia, siendo la macro-autofagia el tipo más estudiado. Éste es un proceso catabólico no selectivo que se activa por estrés nutricional, principalmente hambre de carbono o nitrógeno, y en el cual componentes citoplásmicos son englobados en vesículas de doble membrana denominadas fagolisosomas y liberados en el interior del lisosoma/vacuola para su degradación y posterior reciclaje (He and Klionsky 2009). La autofagia comenzó a estudiarse en levaduras, donde se identificaron los genes implicados en el proceso (*ATG 1-16*). La mayoría de organismos presenta genes ortólogos. La formación de los autofagosomas está regulada por dos sistemas UBL (*Ubiquitin Like Systems*), el primero conjuga las proteínas Atg5p con Atg12p y el segundo conjuga Atg8p con fosfatidiletanolamina, una modificación que permite que una proteína citosólica como Atg8p se una a la membrana de los autofagosomas hasta que éstos son degradados, haciendo de Atg8p el marcador autofágico por excelencia. La fosfolipidación de Atg8p es regularmente visualizada por *Western blot*, pudiéndose diferenciar perfectamente la proteína de membrana de la citosólica (He and Klionsky 2009; Loewith and Hall 2011).

1.7 Objetivos de la Tesis Doctoral

1. Determinar el mecanismo fisiológico de la toxicidad por exceso de PPi en el modelo eucariota *S. cerevisiae*.
2. Analizar la relevancia de la localización núcleo-citosólica de la sPPasa Ipp1p en *S. cerevisiae*.
3. Expresar heterológamente diferentes sPPasas en *S. cerevisiae* y líneas celulares de mamífero.
4. Reproducir en la levadura el escenario metabólico del PPi citosólico de células vegetales.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido comunicados a diversos congresos nacionales e internacionales o han sido publicados en artículos en revistas de ámbito internacional.

Publicaciones:

Serrano-Bueno, G., Manzano-López, J., Muñiz, M., Pérez-Castiñeira, J.R., Hernández, A. y Serrano, A. Inorganic pyrophosphatase Ipp1p is a nucleocytoplasmic shuttling protein whose stability depends on its subcellular localization (manuscrito en construcción)

Serrano-Bueno, G., Hernández, A., López-Lluch G., Pérez-Castiñeira, J.R., Navas P. y Serrano, A. (2012) Inorganic pyrophosphatase defects lead to cell cycle arrest and autophagic cell death through NAD⁺-depletion in fermenting yeast, *Journal of Biological Chemistry* (enviado)

Hernández, A., Serrano-Bueno, G., Pérez-Castiñeira, J.R. y Serrano, A. (2012) Intracellular Proton Pumps as Targets in Chemotherapy: V-ATPases and Cancer. *Current Pharmaceutical Design* **18** (10), 1383-94.

Hernández, A., Serrano, G., Herrera-Palau, R., Pérez-Castiñeira, J.R. y Serrano, A. (2010) Intraorganellar Acidification by V-ATPases: A Target in Cell Proliferation and Cancer Therapy. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **5**, 88-98.

Comunicaciones a congresos:

Serrano, G., Gómez-Jaramillo, L., Pérez-Castiñeira, J.R., Hernández, A., Campos-Caro A. y Serrano, A. (2012) Comunicación-panel: Implications of the nucleocytoplasmic localization of soluble pyrophosphatases in yeast and human cells. XXII Congreso IUBMB – XXXVII Congreso FEBS, Sevilla, España.

Serrano, G., Hernández, A., López-Lluch G., Pérez-Castiñeira, J.R., Navas P. y Serrano, A. (2011) Comunicación-panel: Inorganic pyrophosphatase defects lead to

cell cycle arrest and autophagic cell death through nad⁺-depletion in fermenting yeast. XIV Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Torremolinos, España.

Serrano, G., Hernández, A., López-Lluch G., Navas P. y Serrano, A. (2010)
Comunicación-panel: Cell death and cell cycle arrest by excess pyrophosphate. Pyrophosphate-induced autophagy in fermenting cell. Yeast, an evergreen model, Roma, Italia.

Serrano-Bueno, G., Hernández, A., Pérez-Castiñeira, J.R. y Serrano, A. (2010)
Comunicación-panel: Distribución subcelular y funcionalidad de pirofosfatasa solubles homólogas y heterólogas de origen vegetal en *Saccharomyces cerevisiae*. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Microbiología, Córdoba, España.

Serrano, G., Hernández, A., López-Lluch G., Pérez-Castiñeira, J.R. y Serrano, A. (2009)
Comunicación-panel: Inducción de muerte celular por represión de la pirofosfatasa soluble, una enzima esencial en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Microbiología, Oviedo, España.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1 *Escherichia coli*

2.1.1.1 Estirpes de *E. coli*

Los distintos plásmidos utilizados en este trabajo se propagaron en la estirpe DH5- α (*supE44 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Hanahan 1983).

2.1.1.2 Cultivo de *E. coli* en medio líquido

El material empleado, medios, tubos y matraces, fueron previamente esterilizados en el autoclave. Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio Luria-Bertani (Sambrook, Fritsch et al. 1989),: NaCl 10 g/l, bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 6 g/l. Las células se incubaron en agitadores orbitales a 37 °C y 200 rpm. Los antibióticos se incorporaron al medio a partir de una disolución concentrada, esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m de diámetro de poro, teniendo en cuenta que la temperatura del medio no fuera superior a 50 °C. Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio LB se suplementó con 100 μ g/ml de ampicilina (Ap) ó 50 μ g/ml de kanamicina (Km).

2.1.1.3 Cultivo de *E. coli* en medio sólido

Para cultivo en medio sólido se utilizó medio LB suplementado con agar de grado bacteriológico (Aplichem) al 2% (p/v). Al igual que en los medios líquidos, para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, los medios se suplementaron con el antibiótico correspondiente a las concentraciones antes indicadas y se añadieron a 55 °C aproximadamente, justo antes de extender el medio en placas de Petri.

2.1.2 Levadura2.1.2.1 Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas

Las estirpes de levaduras utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla II.

Tabla II: Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Estirpe	Características
W303-1a	MATa, <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
YPC3	W303-1a <i>ipp1UAS::GALIUAS-IPP1-HIS3</i>
SAH6	YPC3 <i>vph1Δ::KanMX4</i>
SEY6210	MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-200 trp1-901 lys2-801 suc2-9 GAL</i>
SAH16	SEY6210 <i>ipp1UAS::GALIUAS-IPP1-HIS3</i>
SAH17	SAH16 <i>atg8Δ::LEU2</i>
WCGY4a	MATa, <i>ura3 his3-11,15 leu2-3,112 prc1-1</i>
WCGY4-11/22a	MATa, <i>ura3 his3-11,15 leu2-3,112 prc1-1 pre1-1 pre2-2</i>
JRY2334	W303-1a, <i>ade2-1 leu2-3,112 his3-1 ura3-52 trp1-100 can1-100</i>
SAH12	W303-1a <i>pep4Δ::TRP1</i>
NA10	MATa <i>ura3-1, trp1-1, ade2-1, leu2-3, 112, his3-11 (STS1)</i>
NA25	MATa <i>ura3-1, trp1-1, ade2-1, leu2-3, 112, his3-11, sts1-2 (C194Y)</i>
LRY171	NA25 <i>PRE6-GFP::URA3::HIS3</i>
LRY239	NA10 <i>PRE6-GFP::URA3::HIS3</i>
BJ5459	ATCC 208284: MATa, <i>ura3-52 trp1 lys2-801 leu2Δ1 his3Δ200 pep4Δ::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL cir⁺</i>

2.1.2.2 Cultivo de *S. cerevisiae* en medio líquido

Por lo general, las levaduras se cultivaron en medio complejo YPD (Sherman 1985),: extracto de levadura 10 g/l, proteosa peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l.

Para los experimentos con el mutante YPC3 bajo diferentes condiciones metabólicas, se usó el medio YPD descrito anteriormente sustituyendo la glucosa 20 g/l

por galactosa 20 g/l (YPGal, condiciones control), glucosa 5 g/l (condiciones de restricción calórica, CR) o glicerol 30 g/l (YPGli, condiciones respiratorias, MR).

Las levaduras se cultivaron desde placas de medio sólido en tubos de 10 ml con 2 ml de medio. Se dejaron crecer a 30 °C con agitación (150-200 rpm) hasta fase estacionaria. Tras ésto, se reinocularon en matraces Erlenmeyer de volumen variable y se dejaron crecer en las misma condiciones sin sobrepasar una O.D.₆₀₀ igual a 1 durante el tiempo necesario para cada experimento.

Cuando se requirió crecer las células en medios selectivos, se usó medio sintético SD (Sherman 1991),: 0,17 % de Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico (YNB) (Sigma), como fuente de fósforo, potasio, sulfato, magnesio, calcio, vitaminas y oligoelementos, 0,5% de sulfato amónico, y 2% de glucosa. Este medio fue suplementado con un aporte adicional de aminoácidos y nucleótidos dependiendo de las auxotrofías de las estirpes a cultivar (Ausubel, Katagiri et al. 1995). La esterilización se llevó a cabo mediante autoclavado, excepto la mezcla de aminoácidos y nucleótidos que se filtró. Cuando las levaduras debían seleccionarse en galactosa, se empleó el medio SGal, análogo al medio SD, pero en el que la glucosa es sustituida por galactosa en la misma cantidad. En caso de ser necesario, el medio se tamponó con tampón MES-Tris 50 mM a pH adecuado. Los cultivos se realizaron de modo análogo a lo expuesto anteriormente para los medios complejos.

2.1.2.3 Cultivo de *S. cerevisiae* en medio sólido

Las placas de medio complejo YPD o YPGal se obtuvieron suplementado con un 2% de agar bacteriológico a los medios preparados según el apartado anterior.

Para la obtención de placas de medio selectivo, se autoclavó la cantidad de agua necesaria a la que se añadió una cantidad de agar suficiente para que la concentración final fuera del 2%. Tras dejar enfriar hasta 55 °C, el medio se suplementó con los componentes necesarios según los protocolos antes expuestos y se extendió en placas de Petri.

2.1.2.4 Cultivo de *S. cerevisiae* en medios especiales

Para el estudio de la complementación de la V-ATPasa se prepararon placas de medio YPD a pH 5,6 y 7,5, para ello, el medio se tamponó con MES-Tris 50 mM a pH

adecuado. Cuando era necesario, una vez que las placas estaban solidificadas, se suplementaron con bafilomicina hasta una concentración final de 2 μm .

2.1.3 Líneas celulares de mamíferos

2.1.3.1 Líneas celulares utilizadas

La estirpe utilizada para la expresión heteróloga de sPPasas ha sido la línea celular de fibroblastos HEK-293T, línea celular humana epitelial embrionaria de riñón inmortalizada con antígeno T (*Human embryonic kidney cell line 293T*).

2.1.3.2 Cultivo en monocapa de fibroblastos

La línea celular HEK-293T (fibroblastos embrionarios humanos) se cultivó en monocapa en placas P6. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) suplementado con de suero fetal de ternera al 10%, L-glutamina 10 mM y antibióticos (100 IU/ml penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomicina) (Dulbecco and Freeman 1959). Las células fueron mantenidas a una temperatura constante de 37 °C en una incubadora bajo una atmósfera con 5.0 % de CO₂ y los cultivos se mantuvieron hasta un periodo máximo de 2 semanas con cambios del 80% del medio de cultivo cada dos días.

2.2 Recogida de células

2.2.1 Recogida de células de *S. cerevisiae*

La recogida de células para rutinaria se realizó por centrifugación en centrífugas refrigeradas Sorvall™ usando rotores SS34 o GSA y centrífugas Beckman Avanti™ usando rotores JLA 16.250 y JA 25.50. Se utilizaron regímenes a temperatura constante (4 °C), 8000 xg durante 10 min. Para volúmenes de cultivo inferiores a 1,5 ml se utilizó una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C a 5000 xg durante 5 minutos. Cuando en estos experimentos fue necesario transferir las células de un medio de cultivo a otro diferente, se recogieron de la misma manera, se lavaron dos veces en nuevo medio y

finalmente se resuspendieron en el medio apropiado a la concentración celular adecuada.

2.2.2 Recogida de células humanas.

Las monocapas de células adherentes fueron dispersadas mediante tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA por frasco de 25 ml. Para ello previamente se eliminó el medio y se lavaron las células dos veces con 5 ml de PBS sin calcio ni magnesio. Las centrifugaciones se realizaron a una velocidad de 1.000 rpm durante 10 min en tubos de polipropileno a temperatura ambiente.

2.3 Preparación de extractos celulares

2.3.1 Preparación de extractos celulares de *S. cerevisiae*

2.3.1.1 Obtención de fracciones solubles

Para la obtención de fracciones solubles, las células se crecieron durante el tiempo necesario para cada experimento hasta una $O.D._{600} = 0.5-1$ y tras recogerse por centrifugación, se lavaron con agua fría y se resuspendieron en 3 volúmenes de tampón de rotura (**TR**: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glicerol 10%, β -mercaptoetanol 4mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, $MgCl_2$ 10 mM, benzamidina 1 mM, ácido ϵ -aminocaproico 1 mM, PSMF 1 mM) a 0 °C. La rotura se produjo por agitación en presencia de 500 μ l de perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) por cada ml de preparación de rotura. El homogeneizado se centrifugó 20 min a 20000 xg, para eliminar las perlas de vidrio, membranas y restos de células enteras. El sobrenadante constituye el extracto soluble total.

2.3.1.2 Fraccionamiento subcelular: obtención de las fracciones citosólica y nuclear

Todas las centrifugaciones para las preparaciones de fracciones nuclear y citosólica se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-80.

Las células se cultivaron en 500 ml de medio complejo durante la noche hasta alcanzar una $O.D._{600} = 1$. A continuación, las células fueron convertidas en protoplastos mediante digestión de la pared celular con enzima liticosa. Para ello, las células recogidas por centrifugación se lavaron dos veces con agua fría y se resuspendieron en 20 ml de tampón de lavado (**TL**: Tris-HCl 50 mM (pH 9,4), β -mercaptoetanol 20 mM) con el que se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación se lavaron las células con tampón **SPMB** (sorbitol 1,2 M, tampón fosfato 25 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 1 mM), se resuspendieron en tampón SPMB y 16.000 unidades de **liticosa** y se incubaron con agitación suave a 30 °C hasta generar protoplastos. Se considera que el proceso es óptimo cuando la diferencia de $O.D._{600}$ de una alícuota de células resuspendida en agua es diez veces inferior a una alícuota resuspendida en tampón SPMB. Seguidamente se centrifugaron los protoplastos a 3000 xg durante 7 min. y se incubaron con 20 ml de YPD y 1,2 M de sorbitol en agitación suave durante 30 min a 30 °C permitiendo así la reactivación celular. A partir de este punto, todo el proceso se realizó a 4 °C y todos los tampones incluyeron inhibidores de proteasas (PMSF, benzamidina y ácido ϵ -aminocaproico, todos ellos a una concentración final de 1 mM).

Para la separación de fracciones nuclear y citosólica, los protoplastos se resuspendieron en tampón ficoll (**TF**: Ficoll 400 18%, MES-Na 20 mM (pH 6,5), $MgCl_2$ 0,5 mM) y se homogeneizaron con un homogeneizador de teflón 8 veces. Este homogenado se colocó sobre 10 ml de tampón ficoll-glicerol (**TFG**: Ficoll 400 7%, glicerol 20%, MES-Na 20 mM (pH 6,5), $MgCl_2$ 0,5 mM) y se centrifugó 30 min a 21500 xg (rotor Sorvall SW28). Al cabo de la centrifugación se recogieron 10 ml de la fase superior y se centrifugaron nuevamente 30 min a 100000 xg (rotor sorvall 70Ti), obteniéndose como sobrenadante la fracción citosólica libre de núcleos. El precipitado obtenido por centrifugación a 21500 xg se resuspendió en 20 ml de **TF** y se centrifugó 15 min a 3300 xg (rotor Sorvall SW28). Finalmente se obtuvo la fracción nuclear libre de citosol tras centrifugar el sobrenadante 30 min a 21500 xg (rotor Sorvall SW28) y resuspender el precipitado en 500 μ l de **TR** (Zhang and Reese 2006).

2.3.1.3 Preparación de membranas y extractos solubles

Todas las centrifugaciones para las preparaciones de membranas se llevaban a cabo en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-80 usando los rotores 60Ti a 40.000 rpm durante 30 min.

Para la preparación de membranas y extractos solubles de levadura, las células se crecieron durante la noche en 200 ml de medio complejo hasta alcanzar una $O.D._{600} = 0,5$. Tras ser recogidas por centrifugación, se lavaron con agua fría y se resuspendieron en 5 ml de **TR** a 0 °C, tras lo cual se procedió a su rotura por agitación en presencia de perlas de vidrio como se describe en el apartado 2.3.1.1. El homogenado se diluyó hasta 20 ml con tampón de resuspensión (**TR**: Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), glicerol 10%, DTT 2 mM, EDTA 1 mM) y se centrifugó 10 min a 700 xg (rotor Sorvall SS-34), para eliminar las perlas de vidrio y los restos de células enteras. El sobrenadante se centrifugó a 100000 xg (rotor Beckman 60Ti) durante 30 min para sedimentar la fracción total de membranas. El sobrenadante de esta ultracentrifugación constituyó el extracto crudo soluble. El precipitado de membranas se homogeneizó con un homogeneizador de teflón en 4 ml de **TR** y se centrifugó una vez más en las mismas condiciones para eliminar posibles contaminaciones de pirofosfatasa soluble. El precipitado lavado se resuspendió y homogeneizó en 2 ml de **TR**. Esta preparación final constituye la fracción de membranas totales.

2.4 Determinación de la actividad pirofosfatasa

Los ensayos de actividad pirofosfatasa, tanto soluble como de membrana, se realizaron espectrofotométricamente midiendo la liberación de fosfato. Para ello se utilizó el método de Ames (Ames 1966). En disolución ácida y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo de fosfomolibdato amónico que, reducido con ácido ascórbico u otro reductor orgánico, presenta una coloración azul que puede ser medido a una longitud de onda adecuada. El reductor utilizado fue el cloruro de estaño II (Sigma-Aldrich).

Una unidad de actividad pirofosfatasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de PPi en las condiciones que se detallan en los apartados siguientes. La concentración de fosfato se interpoló de una recta de calibrado previamente establecida con ortofosfato sódico.

Para todos los experimentos, las medidas se realizaron por triplicado de forma independiente y los resultados se obtuvieron como la media de todos los datos.

2.4.1 Actividad pirofosfatasa soluble

Las medidas de actividad pirofosfatasa soluble se realizaron en una mezcla de ensayo compuesta por Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), MgCl₂ 2 mM, Na₂PPi 0,3 mM y una cantidad adecuada de la preparación en un volumen final de 200 µl. En todos los casos, se añadió una concentración de NaF 1 mM para inhibir una posible actividad sPPasa residual. Las reacciones enzimáticas se realizaron a 30 °C durante 10 min. La reacción se paró mediante la adición de 400 µl de agua desionizada y 270 µl de una mezcla compuesta por: ácido tricloroacético (TCA) al 30% (p/v), acetato sódico 3,5 M y formaldehído al 37%. El color se desarrolla mediante la adicción sucesiva de 30 µ de molibdato amónico 2% (p/v) y 60 µl de cloruro de estaño 0.16% (p/v). La absorbancia se mide a 750 nm tras 10 min. En todas las determinaciones se realizaron medidas control en ausencia del correspondiente sustrato y de la preparación enzimática.

Las medidas de actividad pirofosfatasa soluble en el caso de sPPasas Familia II, como la sPPasa de *Streptococcus mutans*, se realizó de la misma manera que la descrita anteriormente con la salvedad de que en estos casos la muestra requería una preincubación de 30 min a 30 °C con MnCl₂ 2 mM, previa a la adicción del sustrato.

En todos los casos se midió una segunda actividad añadiendo en la mezcla ensayo el inhibidor de sPPasas NaF (1 mM) obteniendo los valores de actividad fosfatasa en la muestra no debida de las sPPasas. Los valores obtenidos, con esta segunda medida de actividad, se restaron a los adquiridos sin NaF, obteniendo la actividad fosfatasa debida exclusivamente a las sPPasas en cada muestra.

2.4.2 Actividad pirofosfatasa de membrana

Las medidas de actividad pirofosfatasa de membrana se realizaron en una mezcla de ensayo compuesta por Tris-HCl 10 mM (pH 8), MgCl₂ 2 mM, Na₂PPi 0,3 mM y una cantidad adecuada de la preparación de membranas en un volumen final de 200 µl. Las

reacciones enzimáticas se realizaron como se describe en el apartado 2.4.1 (medida de la actividad pirofosfatasa soluble).

En todos los casos, se añadió una concentración de NaF 1 mM para inhibir posibles restos de actividad sPPasa.

En el caso de las determinaciones de actividad para H⁺-PPasas dependientes de potasio, la mezcla de reacción se suplementó con una concentración de KCl 100 mM y se realizaron controles para cada una de las muestras enzimáticas en ausencia de esta sal.

2.5 Análisis de proteínas

2.5.1 Determinación de proteínas

El contenido en proteína de los diferentes extractos se determinó siguiendo el método de Bradford (1976). Para ello, las muestras se suplementaron con agua desionizada hasta un volumen de 0,2 ml y se añadió 1 ml de reactivo de determinación de proteínas (BioRad) diluido 1:5 con agua desionizada, incubándose las mezclas 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia de las mismas a 595 nm. Como patrón, se utilizaron cantidades conocidas de ovoalbúmina.

2.5.2 Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

2.5.2.1 Preparación de las muestras

Antes de cargar las muestras en el gel, éstas se suplementaron con 0,2 volúmenes de tampón de carga 5x, **TC5x**: SDS 1% (p/v), Tris-HCl 60 mM (pH 8,5), azul de bromofenol 0,01% (p/v) y 5% (v/v) de β-mercaptoetanol. Como son condiciones desnaturizantes, las muestras, una vez suplementadas con **TC5x**, se calentaron a 65-100 °C durante 2-10 min, dependiendo si eran preparaciones de membrana o solubles respectivamente.

En el caso de las preparaciones de membrana, la cantidad de proteína deseada se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) de concentración final, manteniéndose en hielo durante 10 min antes de centrifugar en una centrífuga Eppendorf a 13.000 rpm durante 5 min. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se lavaron dos veces con 1 ml de agua, incubándose en hielo y centrifugando del mismo modo. Cuando era necesario concentrar las muestras de proteína soluble, éstas se precipitaron con TCA, de manera análoga a las de membrana, pero los lavados sucesivos se realizaron con 1 ml de mezcla etanol:éter (1:1) y 1 ml de mezcla etanol:éter (1:3). Tras secar unos segundos al aire, las muestras se resuspendieron en **TC5x**.

2.5.2.2 Desarrollo de la electroforesis mediante el método de Laemmli

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida que contenían dodecil sulfato sódico (SDS) según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). El gel separador se preparó al 8, 10 ó 12% (p/v) de poliacrilamida a partir de acrilamida:bisacrilamida 38:2. Los demás componentes fueron: SDS 0,1% (p/v) y tampón Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8). El gel de empaquetamiento de las muestras se preparó al 4% (p/v) de poliacrilamida de la misma composición con SDS al 0,1% (p/v) y tampón Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8). Los geles se polimerizaron con persulfato amónico (APS) 0,1% (p/v), usando como agente catalizador N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) a una concentración final de 6 mM.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V, voltaje constante. Para el desarrollo de la electroforesis, se usaron aparatos de modelos Mini-Protean II y Mini-Protean III (BioRad). Como tampón de electrodos, se utilizó Tris-HCl 25 mM, glicina 0,32 M (pH 8,3) y SDS al 0,1% (p/v).

2.5.2.3 Teñido de geles

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se tiñieron sumergiendo los geles durante 30 minutos en una disolución de azul de Coomassie “Brilliant Blue R” al 0,1% (p/v) en una mezcla 5:4:1 de agua:etanol:ácido acético (v/v/v). Los geles se lavaron a

continuación con esta mezcla para retirar el exceso de colorante y para su posterior mantenimiento se secaron entre dos láminas de celofán durante 24 h.

Para determinar la movilidad electroforética relativa de las proteínas en estudio, se usaron patrones preteñidos See Blue[®] Pre-stained Standards (Novex) y Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (BioRad). Ambos consisten en una serie de péptidos naturales unidos a un colorante azul, cuyas masas moleculares relativas varían entre los 210 kDa de la miosina y los 7 kDa de la aprotinina, en el caso de los patrones de BioRad y los 4 kDa de la cadena β de la insulina, en el caso de los de Novex. Antes de ser cargados en los geles de poliacrilamida, los patrones de Novex se hirvieron a 100 °C durante 3-5 min. Los patrones de BioRad se mantuvieron a -20 °C y se descongelaron inmediatamente antes de cargarlos en el gel, sin ningún tratamiento previo.

2.5.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa se realizó utilizando un aparato de transferencia semi-seca “Trans blot SD” de la marca BioRad y el sistema de tampón de Towbin (Towbin, Staehelin et al. 1979). Tras la electroforesis de las muestras de proteína, el gel de poliacrilamida se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro previamente humedecida con tampón de transferencia (**TT**: Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y metanol 20% (v/v)). Por encima del gel y por debajo de la membrana, se colocó una pila de tres papeles 3 MM Chr (Whatman) humedecidos en el mismo **TT**.

La transferencia se llevó a cabo sometiendo el “sandwich” a un voltaje constante de 25 V durante 45 min. Para comprobar la efectividad de la transferencia, las proteínas transferidas fueron teñidas en el filtro de nitrocelulosa con una disolución de colorante rojo Ponceau al 0,2% (p/v) disuelto en una disolución de TCA al 3% (p/v), tras lo cual se lavó con abundante agua.

2.5.4 Inmunodetección por Western blot

La membrana con las proteínas adsorbidas se incubó en tampón **TBS** (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM), suplementado con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) como bloqueante y Timerosal al 0,02% (p/v) durante 1h para evitar contaminaciones. A continuación, se añadió el antisero inmune en una dilución

apropiada (1:1000 a 1:10.000) y se incubó con agitación a 4° C toda la noche. Tras esta primera incubación, la membrana se lavó tres veces durante 15 min con **TBS** suplementado con 0,1% (v/v) de Tween-20 y una última vez durante el mismo tiempo con la misma disolución de leche en polvo en **TBS** suplementado con 0,1% (v/v) de Tween-20. A continuación se incubó durante al menos 1 h con una dilución 1:10.000 de anticuerpos secundarios (antisuero de cabra anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa de rábano -ROCHE-) en **TBS**. Tras la segunda incubación la membrana se lavó tres veces durante 15 min con **TBS** suplementado con 0,1% (v/v) de Tween-20.

La visualización específica de las proteínas sobre la membrana se realizó mediante quimioluminiscencia. Para ello, tras el último lavado, se añadió de forma uniforme sobre toda la membrana, la solución “Millipore Immobilon™ Western Chemilumminiscent HRP Substrate”, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se captó la señal bien mediante un transiluminador marca Gel Doc™ X.R. (BioRad) conectado a un ordenador personal con el software Quantity One o bien mediante película fotográfica. En este último caso se utilizaron películas fotográficas KONICA que se expusieron a la membrana entre 30 s y 10 min antes de sumergirlas en una dilución 1/10 de solución reveladora (AGFA) hasta que aparecían las bandas. A continuación se sumergió la película en un recipiente con agua para pasarla luego a un recipiente con una dilución 1/10 de solución fijadora (AGFA). Todos los pasos, hasta que se sumergía la película en solución fijadora, se llevaron a cabo en oscuridad con la única iluminación de una luz roja.

2.6 Métodos genéticos de manipulación del DNA

2.6.1 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran detallados en la Tabla III

Tabla III: Plásmidos utilizados

Plásmido	Características	Ref./ casa comercial
pAD4	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos del gen ADH y como marcador de selección el gen LEU2	(Jimenez-Hidalgo, Santos-Ocana et al. 2009)
pRS1024	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos del gen PMA1 y como marcador de selección el gen LEU2	(Villalba, Palmgren et al. 1992)
pRS699	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos PMA-1 y como marcador de selección el gen URA3	(Serrano and Villalba 1995)
pUG35	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor MET25 y el terminador CYC1, permite la fusión en el extremo C-terminal de yEGFP3 y como marcador de selección el gen URA3	(Hegemann, Klein et al. 1999)
pUG36	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor MET25 y el terminador CYC1, permite la fusión en el extremo N-terminal de yEGFP3 y como marcador de selección el gen URA3	(Cormack, Bertram et al. 1997)
pWPXL	Vector de expresión lentiviral Cre/Lox de mamíferos que contiene el promotor EF-1alpha y permite la fusión de EGFP.	(Luther-Wyrsh, Costello et al. 2001)

2.6.2 Métodos de transgénesis

2.6.2.1 Transformación de *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* se obtuvieron directamente del Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC).

La transformación de células competentes se realizó añadiendo a la suspensión celular, previamente descongelada, el DNA en un volumen máximo de 10 µl. Tras 30 min de incubación en hielo, se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 45 s, se incubaron en hielo durante 2 min más, se les añadió 1 ml de medio LB y se incubaron 1 h a 37 °C. Finalmente, las células se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf a 8.000

rpm durante 30 s. Tras eliminar la mayor parte del sobrenadante, se sembraron en placas de medio LB con antibiótico y se dejaron crecer en una estufa a 37 °C durante 12-15 h.

2.6.2.2 Transformación de *S. cerevisiae*

Las levaduras se transformaron usando el protocolo TRAF0 de alta eficiencia del método del litio (Gietz and Woods 2002). Cultivos de 10 ml de la estirpe de levadura deseada se crecían en matraces de 50 ml en medio SC, con la fuente de carbono deseada, durante toda una noche a 30 °C y con una agitación de 150 rpm hasta saturación. A la mañana siguiente, se diluía el cultivo a Abs. 0,2 en un volumen de 10 ml de medio rico YP con la fuente de carbono adecuada. Este cultivo se dejaba crecer bajo las mismas condiciones anteriores durante unas 5 ó 6 horas, y cuando alcanzaba una Abs. 1, se centrifugaba y las células se lavaban con 1 ml de agua a 3000 xg.

Para la transformación, 5 µg de DNA se mezclaban con el precipitado celular y se le añadía 240 µl de PEG (polietilenglicol) al 50%, 36 µl de LiAc 1M, 5 µl de DNA de esperma de arenque o salmón al 1% (p/v) y hasta 360 µl de agua estéril. Tras una vigorosa agitación de 30 s, la mezcla se incubaba en un baño termostático a 30 °C durante 40 min, las células se sedimentaban mediante centrifugación durante 15 s a 13000 rpm y se descartaba el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendía en 100 µl de agua estéril y se extendía en placas de medio selectivo de levadura.

2.6.2.3 Transfección transitoria de líneas celulares humanas

La transfección transitoria de líneas celulares humanas se realizó mediante transfección por liposomas catiónicos. Es un tipo de transfección basada en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y el DNA, que son afines por las membranas celulares, permitiendo la entrada del ácido nucleico en el citosol. El día previo a la transfección se sembraron 500.000 células/pocillo en placas P6 con 2 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal de ternera al 10%, L-glutamina 10 mM y antibióticos. El día de la transfección se cambió el medio de cultivo por 2ml de DMEM sin antibióticos y se transfectaron las células con 4 µg de plásmido en medio OPTIMEM siguiendo el protocolo de la Lipofectamina (Dodds, Dunckley et al. 1998). Para ello se diluyeron 10 µL de LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) en 250 µL de medio

de transfección (medio sin antibióticos ni suero) y se mantuvo la mezcla 5 min a temperatura ambiente. En otros 250 μ l de medio de transfección se diluyeron 4 μ g del DNA a transfectar. Se unieron ambas mezclas y se dejaron otros 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron a la placa con las células en cultivo y pasadas cuatro o seis horas se retiraron los complejos de transfección.

2.6.3 Aislamiento del DNA

2.6.3.1 Aislamiento de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala

Para la purificación de plásmidos de *E. coli* se utilizaron dos métodos: uno rutinario, basado en la lisis alcalina y otro comercial, en el que se utilizó el juego de reactivos “Spin Clean™ Plasmid Miniprep” (MBiotech) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este último se empleó cuando se requerían preparaciones plasmídicas con un alto grado de pureza, como por ejemplo para secuenciación automática de DNA.

La purificación de plásmidos por lisis alcalina, se realizó rutinariamente siguiendo los métodos descritos por Sambrook (Sambrook 1989). El cultivo de células, desarrollado toda la noche a 37 °C en agitación, se recogió por centrifugación (2 min a 8000 xg) en tubos de 1,5 ml y el precipitado celular se resuspendió en 100 μ l de **solución I** (Tris-HCl 25 mM (pH 8), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8)). A continuación, se añadieron 200 μ l de **solución II** (NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v)) y se mezclaron las muestras invirtiendo brevemente hasta diez veces. Para neutralizar, se añadieron 150 μ l de **solución III** (acetato potásico 5 M (pH 4,8)) y se volvió a mezclar invirtiendo los tubos diez veces. A continuación, se realizó una extracción con una mezcla 25:24:1 (v/v/v) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (GE Healthcare) -en adelante PCI- y las fases se separaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min en una centrífuga Eppendorf, quedando una fase orgánica inferior, separada de la fase superior acuosa por una fase blanca, que contenía restos celulares y proteínas desnaturalizadas. Los ácidos nucleicos se precipitaron de la fase acuosa mediante la adición de 1 ml de etanol absoluto. Tras centrifugación a 12000 xg durante 10 min, el precipitado se lavó con 1 ml de disolución de etanol al 70% (v/v) en agua y se centrifugó como se ha descrito. Tras eliminar el sobrenadante, se secó al aire unos min.

Finalmente, los ácidos nucleicos se resuspendieron en 20 µl de agua desionizada suplementada con 0,05% (p/v) de RNAsa A (Sigma).

2.6.3.2 Aislamiento de DNA genómico de levadura

Para el aislamiento de DNA genómico de levadura se utilizó el protocolo descrito por Hoffman (Hoffman and Winston 1987). Las células se crecieron durante toda la noche hasta saturación en un volumen de 10 ml. Se recogieron mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 5 min en una centrifuga Eppendorf y se lavaron con agua dos veces. Tras el último lavado se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se retiró el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 200 µl de **mezcla de Hoffman** compuesta por: Tris-HCl 10 mM (pH 8), Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM. A continuación, para la rotura de las células, se añadieron 100 µl de perlas de vidrio 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) y se agitaron con dos vortex de 1 min cada uno. A continuación se realizó una extracción añadiendo 200 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo y agitando con dos vortex de 1 min nuevamente. Tras la extracción se añadieron 200 µl de mezcla de Hoffman y 200 µl de mezcla 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo. Para precipitar el DNA, se centrifugó el homogenado a 12000 xg durante 10 min y se recuperó la fase acuosa a la que se incorporó 1/50 volúmenes de NaCl 3 M y 500 µl de isopropanol. Tras centrifugar como se ha descrito y eliminar el sobrenadante, se secó al aire unos min. Finalmente, los ácidos nucleicos se resuspendieron en 20 µl de agua desionizada suplementada con 0,05% (p/v) de RNAsa A (Sigma).

2.7 Análisis del DNA

2.7.1 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un aparato MiniCycler™ (MJ Research, EE.UU). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía tampón comercial de la enzima (1x), 0,25 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTPs), 20 pmol de cada oligonucleótido, 0,1-1 µg de DNA y 1 U de Taq polimerasa.

Esta mezcla, una vez desnaturalizado el DNA (94 °C, 5 min), se sometió a varios ciclos sucesivos con los siguientes pasos: desnaturalización del DNA molde (94 °C, 30-60 s), reasociación de los cebadores (50-65 °C, 60 s), y polimerización (72 °C, tiempo requerido a razón de 1 min/kb). Por último, se incubó a 72 °C durante 10-20 min para la elongación final. Los resultados de las reacciones de amplificación se analizaban en geles de agarosa.

Para las amplificaciones de fragmentos de DNA encaminados a incorporarse en vectores de expresión se utilizó la polimerasa de alta fidelidad iProof™ (BioRad), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

2.7.1.1 Oligonucleótidos utilizados

En la Tabla IV se presentan los oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR durante este trabajo.

Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia
CLB5_FW	ATGGGAGAGAACCACGAC
CLB5_RW	CTTTTTTGAACGGCGCTAAC
CLB3_FW	ATGCATCATAACTCACAGTC
CLB3_RW	GCAGCTGAATCCAATCTTTC
CLN3_FW	CCTTGACCGCGCTTTGG
CLN3_RW	GATTTGAAACTGGAGGGG
ACT_FW	GGATTCTGAGGTTGCTGC
ACT_RW	GTGAGGTAGAGAGAAACC
ATG8_SpeI_FW	CCCCTAGTATGAAGTCTACATTTAAG
ATG8_XhoI_RW	CCCCAATTCATGATCCAATATCAAAGGAAATG
IPP1_BamHI_FW	CCCGGATCCATGACCTACACTACCAG
IPP1_SalI_RW	CCCGTCGACTTAAACAGAACCGGAG
GFP-NLS_RW	ATTCTCGAGCTATTTAACAACGACCTTTCTCTTCTTTTTTGG TTTGTACAATTCATCCATACCATG
IPP1_NES_RW	ATTGTGACCAAGGTCAATCTCTCAAAGGAGGCAATTGC AAAACAGAACCGGAGATGAAG
RT_IPP1_FW	AGTCAAGCAAGTTAAGGC
RT_IPP1_RW	CGGAGATGAAGAACCAC

Mut_IPP1_FW	ATGTGTTGGAAATTGGTGAAC
Mut_IPP1_RW	CAATTGGAACCGTTGCCACCAAC
Seq1_Mut_IPP1	CTTTGACAAAGGGAGTGG
Seq2_Mut_IPP1	CAAGGAAGAACTTTGAACCC
IPP2_BamHI_FW	CCCGGATCCATGAATTTATTACGAATGAATG
IPP2_SalI_RW	CCCGTCGACTTAAACGTAATACCATTTTTG
IPP2*_BamHI_FW	CCCGGATCCATGTTTTATCCATTCGTAATC
PPA1_BamHI_FW	CCCGGATCCATGAGCGGCTTCAGCACC
PPA1_SalI_RW	CCCGTCGACTTAGTTTTCTGGTGATGGAAC
ATPPA1_BamHI_FW	CCCGGATCCATGAGTGAAGAACTAAAGATAAC
ATPPA1_SalI_RW	CCCGTCGACTCAACGCCTCAGGGTGTGG
ATPPA6_BamHI_FW	CCCGGATCCATGGCGGCTACTAGAGTG
ATPPA6_SalI_RW	CCCGTCGACTCAGTAAAGTGAAAGGTC
ATPPA6*_BamHI_FW	CCCGGATCCATGGTCTGGAAAGAAGTTTC
SYPPA_BamHI_FW	CCCGGATCCATGGCAGGGGAAAATAGAC
SYPPA_SalI_RW	CCCGTCGACCTATTTGTAGTTCTTAACGC
SMPPA_BamHI_FW	CCCGGATCCATGTCTAAAATTTTAGTTTTG
SMPPA_SalI_RW	CCCGTCGACTTACCCATTA AAACTTTC

2.7.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, según describió Sambrook (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Los geles se prepararon en tampón **TBE** (Tris-borato 90 mM (pH 8,0) y EDTA 2 mM). La concentración de agarosa (p/v) en los geles era variable entre el 0,7% (para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1 kb) y el 1% (para bandas de peso molecular inferior a 1 kb). Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementaron con **tampón de carga de DNA** compuesto por 7,2% (v/v) de glicerol, EDTA 20 mM (pH 8,0), azul de bromofenol 0,08% (p/v) y xileno-cianol FF 0,08% (p/v). Como patrones de peso molecular se utilizaron los fragmentos resultantes de la digestión completa del DNA del fago lambda con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos horizontales de diferentes marcas y modelos, dependiendo del tamaño de gel requerido, aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V. Para la detección del DNA en los geles y su visualización, éstos se suplementaron con bromuro de etidio (1 µg/ml). La visualización de los geles y

el almacenamiento de las imágenes se llevó a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta modelo BIO-PRINT[®] de la marca UVP o modelo Gel Doc[™] X.R. (BIORAD) conectado a un ordenador personal que permitía realizar fotografías gracias a la incorporación de una cámara CCD acoplada al aparato.

2.7.3 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Por lo general, los fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel de agarosa, tal como se describe en el apartado anterior, se extrajeron usando un kit de purificación de DNA desde geles de agarosa “Mini Elute[™] Gel Extraction Kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunos casos, la purificación se realizó mediante congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ del trozo de agarosa correspondiente en una jeringa de 1 ml y posterior extracción por presión de la fase líquida. Esta fase se sometió después a extracción con PCI, tras lo cual el DNA se precipitó con 1/50 volúmenes de NaCl 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 20 min. El precipitado obtenido tras centrifugación se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 8-10 μl de agua desionizada.

2.7.4 Determinación de la concentración y pureza del DNA

La concentración de las disoluciones de DNA se estimaron sometiendo muestras de las mismas a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio, tal como se indica en el apartado anterior. Una vez terminada la electroforesis, se comparó la intensidad de la banda obtenida con la de los patrones de DNA del fago λ que se resolvían simultáneamente en el mismo gel y de los cuales se cargaba una cantidad conocida.

Para la estimación de la pureza de las preparaciones de DNA genómico, 1 μl de las mismas se diluyó hasta 0,5 ml con agua y se midió su adsorbancia UV en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, tanto a 260 nm como a 280 nm. La concentración de DNA se estimó usando el coeficiente de extinción $E_{260} = 0,2\text{ (mg/ml)}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Como

criterio de pureza se usó la relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}), que para una preparación de alta pureza se encontraba entre 1,8 y 1,9.

2.7.5 Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas, por la marca comercial Takara. Las reacciones se llevaron a cabo, en su mayor parte, en un volumen de 20 μ l, según las recomendaciones del fabricante y en el tampón suministrado con cada enzima. Las digestiones simultáneas con dos o más enzimas de restricción se realizaban en un tampón compatible de las mismas casas comerciales o en tampón OPA (One-Phor-All) compuesto por: 100 mM Tris-acetato (pH 7,5) 100 mM, acetato de magnesio 100 mM, y acetato de potasio 500 mM. En caso de que las enzimas no fuesen compatibles en ninguno de los sistemas de tampones, la restricción se realizó de forma sucesiva en tampón OPA, usando primero la enzima que requería una concentración mayor de este tampón. A continuación la enzima se inactivó a 80 °C durante 15-20 min y la muestra se diluyó hasta la concentración de tampón adecuada para la segunda enzima. En caso de que la primera enzima no pudiera inactivarse por calor, la restricción se llevó hasta un volumen de 50 μ l y se extrajo con 50 μ l de PCI. La fase acuosa se precipitó con 1/50 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,3) y 2 volúmenes de etanol absoluto y el precipitado se resuspendió en el tampón adecuado para la segunda enzima.

Las restricciones de DNA de plásmido se incubaron durante tiempos variables entre 1 h (para el análisis de las minipreparaciones de DNA de plásmido de *E. coli*) y 12 h (para asegurar la digestión completa en el caso de la obtención de fragmentos de DNA para posterior subclonado).

2.7.6 Desfosforilación de extremos del DNA

Para realizar ligaciones de fragmentos de DNA con extremos romos fue conveniente desfosforilar los extremos del plásmido sobre el que iba a realizarse la ligación para aumentar así la eficiencia de la misma. Para ello, se obtuvo una preparación del plásmido según el protocolo descrito en el apartado 2.6.3.1, con la salvedad de que, en el paso final, el DNA se resuspendió en agua desionizada sin RNasa A. Una fracción de 1 μ g del plásmido así obtenido se sometió a restricción con la

enzima deseada en un volumen final de 20 μ l, incubando al menos 4-6 h. Una vez que la digestión era completa, a esta mezcla de reacción se le añadió 1 U de fosfatasa alcalina (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, **Amersham Pharmacia Biotech**), 6 μ l de tampón 10x comercial y agua desionizada hasta un volumen final de 60 μ l. Tras incubar 30 min a 37 °C, se añadió 1 U más de enzima y se repitió la incubación. A continuación, la mezcla de reacción se suplementó con 2 μ l de EDTA 0,5 M (pH 8), 1 μ l de RNasa A 1% (p/v) y 6 μ l de tampón de carga de DNA, y se calentó a 75 °C durante 15 min para inactivar las enzimas. El vector desfosforilado se sometió finalmente a electroforesis en un gel de agarosa y la banda correspondiente se purificó según se describe en el apartado 2.7.3

2.7.7 Formación de extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes

Para obtener extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes, la muestra de DNA se trató con T4 DNA polimerasa (Takara). Tras la restricción de 1 μ g de DNA en un volumen final de 20 μ l, ésta se comprobó mediante electroforesis de una fracción de 2 μ l de la misma y en un volumen final de carga de 10 μ l. Cuando la digestión fue completa, en el mismo tubo, se añadieron 1 μ l de disolución 25 mM de dNTPs y 2 unidades de la polimerasa y se incubó la mezcla a 14 °C durante 30 min en un baño termostaticado. Si se iba a proceder a una segunda restricción del DNA, se añadían 80 μ l de agua desionizada y 100 μ l de PCI para inactivar la enzima, se agitaba en el vórtex y se centrifugaba. El sobrenadante acuoso se precipitaba con 1/50 volúmenes de NaCl 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Si no era necesaria una restricción posterior, la muestra tratada con T4 DNA polimerasa se cargaba en un gel de agarosa y se sometía a electroforesis para aislar el fragmento deseado.

2.7.8 Formación de extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes

El tratamiento de fragmentos con extremos 5' protuberantes para la formación de extremos romos se llevó a cabo por dos procedimientos distintos. El primero, consistió en un tratamiento del DNA con T4 DNA polimerasa análogo al descrito en el apartado anterior. El segundo procedimiento consistió en el tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Promega). Al igual que en el caso anterior, la reacción de restricción, en 20 μ l de volumen final, se suplementó con dNTPs (1 μ l de

una disolución 25mM de cada uno) y se le añadieron 2 unidades de la enzima, incubando a temperatura ambiente durante 30 min. La muestra tratada con Klenow se procesó de modo análogo al descrito en el apartado anterior.

2.7.9 Ligación de fragmentos de DNA

La ligación de fragmentos de DNA se realizó mezclando preparaciones de los fragmentos e incubando la mezcla en presencia de 1-3 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (MBL). Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l del tampón comercial de la enzima (Tris-HCl 40 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 0,5 mM). La ligación de fragmentos de DNA con extremos cohesivos se incubaron a 14 °C durante al menos 2 h ó a 4 °C durante 16-24 h. Las ligaciones con extremos romos se incubaron a 14 °C durante 16 h ó a 4 °C durante al menos 2 días.

2.7.10 Secuenciación automática del DNA mediante marcaje fluorescente

La secuenciación automática del DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Parasitología Molecular y Biomedicina "López-Neyra" de Granada. El equipo utilizado fue un secuenciador ABI 373 XL Stretch con un termociclador PE 9600, usando para el marcaje el kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.0 (PE Biosystems). Los cromatogramas se visualizaron y analizaron usando el programa ApE (v2.0.39).

2.8 Aislamiento y análisis del RNA

Para evitar la degradación del RNA por acción de RNAsas se tomaron las siguientes precauciones: todo el material de vidrio utilizado se esterilizó a 200 °C durante 2 h en un horno y todas las disoluciones utilizadas, excepto los tampones Tris, fueron preparadas con agua desionizada autoclavada. El material de plástico utilizado se esterilizó en autoclave o era material comercial ya estéril y libre de RNAsas.

2.8.1 Aislamiento de RNA en *S. cerevisiae*

Para el aislamiento de RNA de levadura las células se cultivaron toda la noche en un volumen de 25 ml hasta que alcanzaron una $O.D._{600} = 1$. Tras recoger las células mediante centrifugación y lavarlas con agua desionizada, se resuspendió el pellet en 500 μ l de tampón **LETS** (Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), LiCl 0,1 M, EDTA 10 mM y SDS 0,2%) y 500 μ l de fenol-Tris para RNA. Se añadieron 500 μ l de perlas de vidrio 0,4-0,6 mm diámetro (Sigma-Aldrich) y se agitaron las muestras vigorosamente en un vortex, 3 por 1 min, con periodos intercalados de 1 min en hielo. A continuación, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 min y se procedió a la extracción añadiendo al sobrenadante una mezcla 5:1 (v/v) de fenol:cloroformo y agitando las muestras vigorosamente en un vortex. La extracción se repitió dos veces más y se realizó una siguiente extracción añadiendo al sobrenadante una mezcla 24:1 (v/v) de cloroformo-alcohol isoamílico. Tras la última centrifugación, se recogió el sobrenadante y se precipitó el RNA añadiendo 1/50 volúmenes de NaCl 3M y dos volúmenes de etanol absoluto. Finalmente el pellet se lavó con etanol 70% y tras dejarse secar unos minutos se resuspendió en 50 μ l de agua desionizada.

2.8.2 Estimación de la concentración, pureza e integridad del RNA

De forma análoga a la descrita en el apartado 2.7.4, fracciones de 1 μ l de la preparación de RNA se diluyeron en 0,5 ml de agua y su absorbancia ultravioleta se midió en cubetas de cuarzo, tanto a 260 como a 280 nm. Como criterio de pureza se consideró una relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 y 2. Para la estimación de la concentración se usó un coeficiente de extinción $E = 0,25 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Adicionalmente, 1 μ l de preparación se disolvió en 10 μ l de agua desionizada, se añadieron 2 μ l de **tampón de carga de RNA** (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM (pH 8,0), azul de bromofenol 0,45% (p/v)) y 0,5 μ l de bromuro de etidio (1 mg/ml) para realizar una electroforesis y visualizar la muestra en geles de agarosa al 0,7% (p/v) preparados en tampón TBE (ver Apdo. 2.7.2). Esto permitió comprobar la integridad de las muestras y la concentración relativa de unas respecto a otras, según la intensidad de las bandas observadas.

2.8.3 Obtención de cDNA a partir de RNA

Para la obtención de cDNA se usó el juego de reactivos “QuantiTect[®] Reverse Transcription kit” (Qiagen). 1 µg de RNA total aislado fue tratado con DNasa para reducir el DNA genómico contaminante hasta niveles indetectables por PCR. Posteriormente se añadió la enzima retrotranscriptasa y se incubó a 42 °C durante 30 min según las especificaciones del fabricante. La enzima se inactivó incubando la mezcla a 95 °C durante 2 min y posteriormente se añadió a la preparación 40-80 µl de agua libre de DNAsas.

2.8.4 RT-PCR

Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la PCR en un aparato MiniCycler[™] (MJ Research, EE.UU). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía tampón comercial de la enzima (1x), 0,25 mM de cada desoxirribonucleótidos (dNTPs), 10 pmol de cada oligonucleótido, y 1 U de Taq polimerasa. 1 µl del cDNA obtenido se utilizó como molde para la reacción, que constó de 25 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación de los oligonucleótidos entre 55 °C y 65 °C y tiempos de elongación a 72 °C variables según el tamaño del fragmento a amplificar. Finalmente, se añadió un paso final de 15 min a 72 °C y 5 min a 25 °C. Los resultados de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa y se cuantificaron utilizando el mecanismo descrito en el apartado 2.7.2.

2.9 Análisis de secuencias de DNA y proteínas mediante métodos informáticos

La búsqueda de pautas abiertas de lectura (ORF), la traducción de las secuencias de los nucleótidos a aminoácidos y la búsqueda de las dianas de restricción, se realizó con el programa informático "ApE" (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). Las bandas de DNA secuenciadas se analizaron utilizando el algoritmo BLAST (Altschul, Madden et al. 1997). El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos realizado para los estudios de filogenia molecular se confeccionó usando el programa CLUSTAL X. Las secuencias de aminoácidos que no se generaron en nuestro grupo se obtuvieron de la página web de proyectos genoma de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>).

2.10 Curva de crecimiento de los cultivos de levadura

Para la confección de curvas de crecimiento, las células se cultivaron en medio líquido como se describe en el apartado 2.1.2 y, a distintos tiempos, se tomaron muestras que permitieron determinar la O.D.₆₀₀ en un espectrofotómetro CARY 1E.

2.11 Determinación de los niveles de pirofosfato celular (Upson, Haugland et al. 1996)

Para la cuantificación de PPI intracelular las células se cultivaron en el medio líquido adecuado durante 24 h en condiciones de cultivo semi-continuo. Se recogieron aproximadamente 10^9 células mediante centrifugación, se lavaron con agua fría y se rompieron con 1ml de 4% de ácido perclórico. Para ayudar a la rotura celular, las células se sometieron a cinco ciclos de vortex de 1 min en presencia de perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich). Tras decantar las perlas de vidrios y restos celulares mediante centrifugación, se neutralizaron los extractos mediante la adición secuencial de 140 μ l de 5M KOH y 60 μ l de 1M Tris-HCl (pH 7,5). Posteriormente se centrifugó de nuevo durante 30 min para eliminar las sales de fosfato. El PPI se midió en el sobrenadante utilizando un kit comercial (Molecular Probes, E-6645) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para descartar los niveles de fosfato interferente se realizó una medida para cada muestra sin añadir a la mezcla de ensayo pirofosfatasa inorgánica.

2.12 Determinación de los niveles celulares de piridín nucleótidos.

Para la determinación de los niveles celulares de piridín nucleótidos las células se cultivaron en el medio líquido adecuado durante 18 o 36 h en condiciones de cultivo semi-continuo. Se recogieron $2,5 \times 10^7$ células mediante centrifugación, se lavaron con agua fría, se resuspendieron en 50 mM de NaOH (extracción de NADH) o en 50 mM de HCl (extracción de NAD⁺) y se calentaron a 60 °C durante 30 min en un termobloque Grant-bio PHMT. A continuación se neutralizaron los extractos con 100 μ l de Tris Base 0,4 M (extracción de NAD⁺) o con 50 μ l de HCl 0.1 M, 50 μ l de agua y 200 μ l de Tris-HCl (pH 8) 100 mM (extracción de NADH) y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10

min. Las coenzimas se determinaron en el sobrenadante mediante un ensayo acoplado añadiendo 10 mM de bicina (pH 8), 15 unidades/ml de alcohol deshidrogenasa de levadura (Sigma-Aldrich), 0.4 mg/ml de metasulfato de fenazina, 0,25 mg/ml de azul de tetrazolio y 3% de etanol. Las coenzimas fueron medidas espectrofotométricamente a 570 nm como la producción de formazán.

2.13 Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada por la capacidad de formar colonias. Se sembraron 500 células, según las estimaciones mediante O.D.₆₀₀, en placas con medio sólido adecuado. La supervivencia se calculó como el porcentaje de colonias formadas a partir del número de células inoculadas inicialmente. Dado que las diferentes condiciones de cultivo podrían acarrear alteraciones en el número de células estimado por absorbancia debido a las diferencias de tamaño, las estimaciones fueron corregidas en paralelo mediante el recuento de células de una alícuota del cultivo en un hemocitómetro.

2.14 Microscopia

El análisis microscópico de levaduras se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica DM 6000B. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital acoplada al microscopio y el software Leica AF600.

El análisis de las células humanas por microscopía de fluorescencia se realizó en un microscopio Olympus BX40. Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara digital acoplada al microscopio y el software Cell-D (Olympus).

2.14.1 Análisis de localización subcelular mediante microscopia de fluorescencia

Para el análisis de la localización subcelular mediante microscopia de fluorescencia en levaduras, las células se crecieron durante toda la noche en el medio de cultivo adecuado. A continuación, se recogieron mediante centrifugación a 700 xg en una centrífuga de mesa eppendorf y se resuspendieron en agua. Para marcar los núcleos de levadura se utilizó el marcador fluorescente de DNA Hoechst 33342 (2 µg/ml, Sigma-

Aldrich), las células se incubaron durante 30 min en agitación suave y oscuridad y a continuación se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante. Para el montaje de las preparaciones, los cubre objetos se trataron con una disolución de polilisina (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml y se secaron, antes de depositar en cada uno 10 μ l de la suspensión de células. Tras 10 s se retiró el líquido sobrante de los cubre objetos, se dejaron secar al aire y se colocaron sobre los portas para ser observadas al microscopio.

En el caso de las líneas celulares humanas, las células se despegaron de la placa de cultivo y se lavaron con PBS. A continuación se resuspendieron con medio de cultivo completo (200 μ l) y se cubrieron con una cámara de incubación. Se dejaron 6-7 horas en el incubador celular para que se volvieran a pegar y adquirieran la forma de fibroblasto típica de estas células. Finalmente se lavaron en un Coplin-Jar con PBS y se les añadió una gota de medio de montaje conteniendo para microscopía con DAPI incorporado.

2.14.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para la determinación de la presencia de ROS, las células se cultivaron a 30 °C con agitación en condiciones control, SG y CR durante 18 h y en condiciones MR durante 36 h. A continuación se incubaron con dihidrorodamina-123 (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) durante 2 h a 30 °C con agitación. Tras este periodo, se montaron las preparaciones como se describe en el apartado anterior y se observaron bajo el microscopio utilizando un filtro para dihidrorodamina-123. Como control positivo se utilizaron células YPC3 tratadas con H₂O₂ 1 mM durante 3 h a 30 °C con agitación.

2.14.3 Evaluación de autofagia con el colorante vital fluorescente FM4-64

La acumulación de vesículas autofágicas en la vacuola se determinó mediante el método descrito por Journo (Journo, Winter et al. 2008) usando el colorante vital fluorescente FM4-64 (Calbiochem, #574799). Las células se cultivaron a 30 °C con agitación en condiciones control, SG y CR durante 18 h y en condiciones MR durante 36 h. A continuación se incubaron con FM4-64 (1 μ M) durante 4h a 30 °C con agitación. Se eliminó el exceso de colorante FM4-64 de las muestras por centrifugación

lavando con medio sin colorante, se montaron las preparaciones como se describe en el apartado 2.14.1 y se observaron las células bajo el microscopio utilizando el filtro para Rojo Texas. Como control positivo se utilizaron células YPC3 mantenidas en hambre de nitrógeno durante 5 h a 30 °C con agitación.

2.14.4 Evaluación de apoptosis. Ensayo de TUNEL.

La evaluación de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL se realizó siguiendo el protocolo descrito por Madeo (Madeo, Frohlich et al. 1997). Las células se cultivaron a 30 °C con agitación en condiciones control, SG y CR durante 18 h y en condiciones MR durante 36 h. A continuación, se fijaron las células incubándolas durante 1 h a 25 °C en 1 ml de paraformaldehído 4% en PBS (pH 7,4), se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 10 min a 25 °C en 1 ml de **solución de bloqueo** (H₂O₂ 3% en PBS). Para generar protoplastos se trataron las células con liticasa (25 unidades/ml) durante 45 min a T^a ambiente y seguidamente se permeabilizaron incubando durante 5 min en hielo en **solución de permeabilización** (Tritón 0,1%, citrato sódico 0,1% y sorbitol 1,2 M). Finalmente se tiñeron las células con la mezcla de reacción del kit “*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD” (Roche Applied Science, #11684817910) durante 1h a 37 °C. Tras lavarse con PBS, se montaron las preparaciones como se describe en el apartado 2.14.1 y se observaron las células bajo el microscopio usando el filtro utilizado para detectar la fluorescencia de la proteína GFP. Como control positivo se utilizaron células tratadas con H₂O₂ 1 mM durante 3 h.

2.15 **Determinación del tamaño celular**

El tamaño celular se determinó a partir de micrografías de contraste obtenidas en el microscopio de fluorescencia Leica DM tipo 6000B. Se calculó el tamaño celular aparente por célula utilizando el programa NIH ImageJ (Collins 2007).

2.16 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo con yoduro de propidio

El marcaje de las células con yoduro de propidio se realizó como está descrito por Sazer y Sherwood (Sazer and Sherwood 1990). Se recogieron 500 μl de células ($\text{O.D.}_{600} = 1$) mediante centrifugación a 700 $\times g$ durante 10 min en una centrífuga de eppendorf. Para fijar las células, el precipitado se resuspendió en 200 μl de agua; mientras se agitaban las células en el vórtex a baja velocidad, se añadieron 800 μl de etanol absoluto gota a gota. Las células se fijaron durante toda la noche a 4 °C. A continuación las células se lavaron con 1 ml de tampón citrato 50 mM, se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón con 0,25 mg de RNasa A (Sigma-Aldrich) y 20 μg de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche en oscuridad. Finalmente se sonicaron las células durante 1 min al 50% y se analizaron en el citómetro de flujo Coulter Epics XL (Hernández, López-Lluch et al. 2009).

2.17 Determinación de la estabilidad proteica. Ensayo de pulso y caza

El protocolo utilizado para la determinación de la estabilidad proteica fue descrito por Sutterlin et al en 1998 (Sutterlin, Escribano et al. 1998). Las células se crecieron durante toda la noche en el medio de cultivo sintético adecuado hasta que alcanzaron una $\text{O.D.}_{600} = 1$. Las alícuotas ($3 \cdot 10^7$ células/tiempo) se lavaron dos veces, se resuspendieron en 1,5 ml de medio sintético sin metionina y se incubaron a 30 °C con agitación durante 15 min. A continuación, las células se marcaron durante 3 min con un coctel de metionina radiactivo con metionina- ^{35}S (NEG772002MC – PerkinElmer) y se siguieron durante determinados tiempos con una mezcla: metionina 0,003% (w/v), cisteína 0,003% (w/v) y sulfato de amonio 3mM. Se tomaron alícuotas de 500 μl y se detuvo la caza mediante la adición de 15 μl de azida sódica 2M a 4 °C.

Posteriormente se lisaron las células mediante agitación mediante vórtex a 4 °C con perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) y en tampón **TEPI** (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas). Los lisados se hirvieron en presencia de 1% de SDS durante 3 min y se centrifugaron 15 min en una centrífuga para eppendorf. Al sobrenadante recogido se le añadieron 5 ml de tampón **TNET** (Tris-HCl 100mM (pH 8), NaCl 100 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 1%) y

los extractos se incubaron con anticuerpos policlonales contra GFP y proteína A-sefarosa (GE Healthcare) durante 12 h a 4 °C. Los inmunoprecipitados se lavaron cuatro veces con tampón TNET, se resuspendieron en tampón de muestra de Laemmli y se analizaron por SDS / PAGE, seguido por la exposición y cuantificación del gel en un escáner PhosphorImager Fujifilm FLA-5100.

2.18 Estadística

Todos los experimentos llevados a cabo durante esta Tesis doctoral se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t Student con $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Mecanismo fisiológico de la toxicidad por exceso de PPi en el modelo eucariota *Saccharomyces cerevisiae*

Existen hasta la fecha estudios que postulan la necesidad de pirofosfatasa inorgánicas (PPasas) en el anabolismo celular (Heinonen 2001). Algunos trabajos han abordado el efecto de la carencia de estas enzimas en procariotas y en eucariotas. Sin embargo, estos estudios únicamente han mostrado que la carencia de enzimas que hidrolizan pirofosfato (PPi) genera parada del crecimiento en *Escherichia coli* (Chen, Brevet et al. 1990) y letalidad aparente en eucariotas (Giaever, Chu et al. 2002). En la actualidad no existe ningún estudio profundo sobre el mecanismo fisiológico de la toxicidad del exceso de PPi producido por la deficiencia de PPasas en eucariotas.

3.1.1 Efecto de la deficiencia de Ipp1p en la viabilidad celular

Con el fin de estudiar la cinética de los eventos relacionados con la deficiencia en PPasas, así como determinar la importancia celular de la homeostasis del PPi en eucariotas, se utilizó la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae*. YPC3, donde el gen *IPP1*, que codifica la sPPasa citosólica Ipp1p, está regulado por el promotor inducible/reprimible GAL1 (Perez-Castineira, Lopez-Marques et al. 2002).

En trabajos previos se han asociado la regulación del metabolismo del fosfato y la del metabolismo del carbono (Carroll and O'Shea 2002). Por otro lado, cada vez más se asocia la viabilidad celular con el tipo y disponibilidad de fuente de carbono en muchos organismos, en particular con la dicotomía entre fermentación y respiración, y más recientemente, con la disponibilidad calórica (Verstrepen, Iserentant et al. 2004). Teniendo en cuenta estos aspectos, se compararon las células control, crecidas en 2% de galactosa (promotor *GAL1* inducido) con células crecidas en tres condiciones represivas: concentración estándar de glucosa (SG, 2% de glucosa), restricción calórica (CR, 0.5% de glucosa) y condición estándar de respiración (MR, 3% de glicerol).

Con el fin de comprobar la eficiencia del promotor GAL1, se midieron los niveles de PPi celulares en todas las condiciones de cultivo. Como era de esperar, tras 24 horas, los niveles celulares de PPi aumentaron significativamente en condiciones represivas, llegando a valores 16 veces superiores en células SG y CR y 10 veces superiores en células MR, respecto a las células control (Figura 3.1.1).

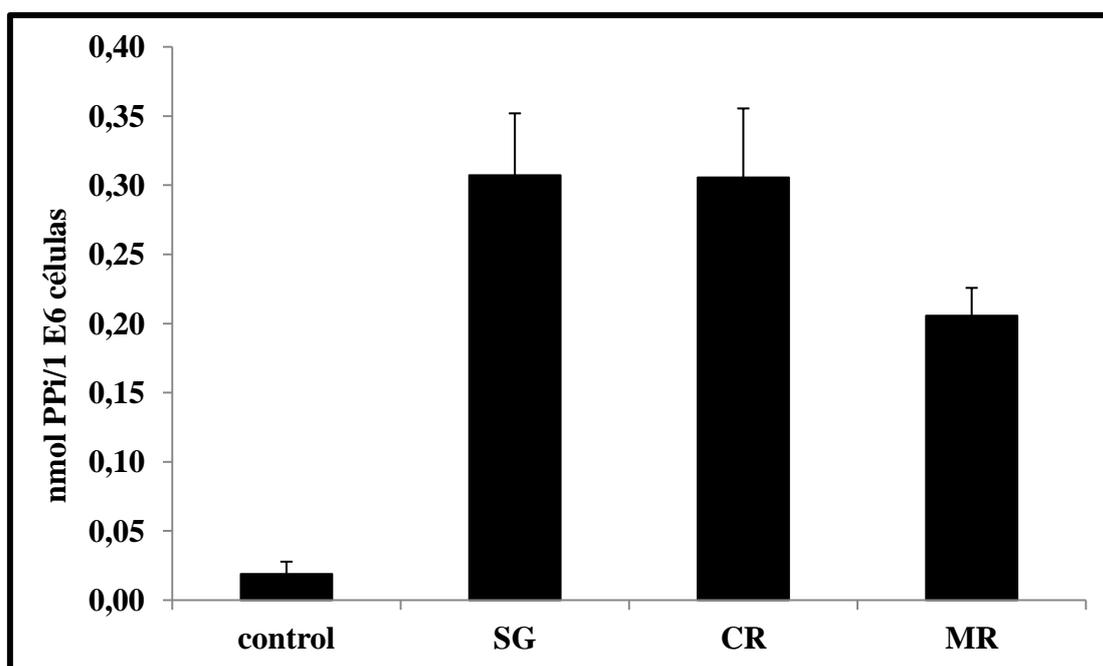
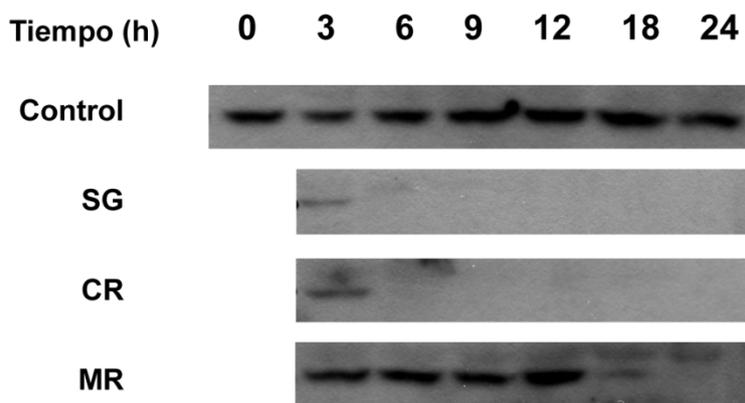


Figura 3.1.1: Niveles de PPi celulares en las diferentes condiciones de cultivo. Las cantidades de PPi se midieron en extractos totales a partir del mismo número de células como se describe en el apartado de materiales y métodos. Control: 2% galactosa, SG: 2 % glucosa (estándar glucosa), CR: 0,5% glucosa (restricción calórica) y MR: 3% glicerol (respiración obligada).

Se analizaron también los niveles de proteína Ipp1p y la actividad de hidrólisis de PPi en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 3.1.2). Ambos parámetros disminuyeron drásticamente en los casos en los que las células utilizaron glucosa como fuente de carbono (células SG y CR), en las que el promotor GAL1 está reprimido activamente. Además esta caída se produjo independientemente de la concentración de glucosa. En el caso de las células MR, aunque también se observó disminución tanto de los niveles de Ipp1p como de la actividad PPasa, ésta es más lenta, debido a que, en estas condiciones de cultivo, el promotor GAL1 está inactivo (Schneider and Guarente 1991). De cualquier modo, los niveles de Ipp1p fueron indetectables a las 6h, en el caso de las células SG y CR, y a las 24h, en el caso de las células MR. En el caso de las células control, tanto los niveles de proteína como la actividad PPasa se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo.

A



B

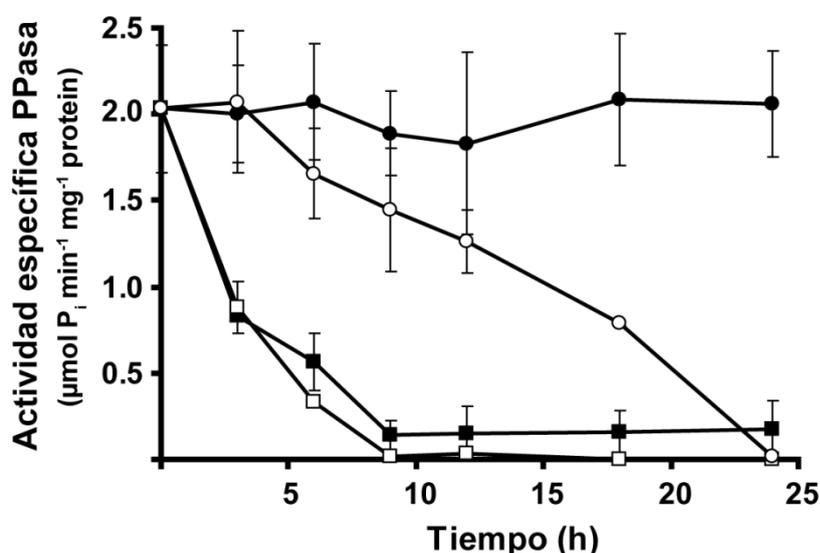


Figura 3.1.2: Niveles de sPPasa y actividad de hidrólisis de PPi en función de la fuente de carbono y el tiempo. A) Curso temporal de la desaparición de Ipp1p. Los niveles de Ipp1p se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo producido contra una sPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. En cada pocillo se cargaron 50 µg de extracto celular total. B) Curso temporal de la disminución de la actividad de hidrólisis de PPi. Se midió el fosfato liberado a partir de PPi en extractos totales como se describe en materiales y métodos. Leyenda; círculos negros: control, círculos blancos: MR, cuadrados negros: SG y cuadrados blancos: CR.

Se analizó también la variación en la tasa de crecimiento midiendo el incremento de la densidad óptica a 600 nm en cultivos semi-continuos: se observó una tasa de crecimiento constante en el caso de las células control, mientras que en el resto dicha tasa se reducía (Figura 3.1.3). Esta reducción fue drástica en el caso de las células SG y CR, ya que a las 18 h la tasa de crecimiento de estas células era indetectable. En las células MR, sin embargo, el arresto en la tasa de crecimiento se alcanzó a las 36h, lo que concuerda con una pérdida de Ipp1p más lenta en estas condiciones.

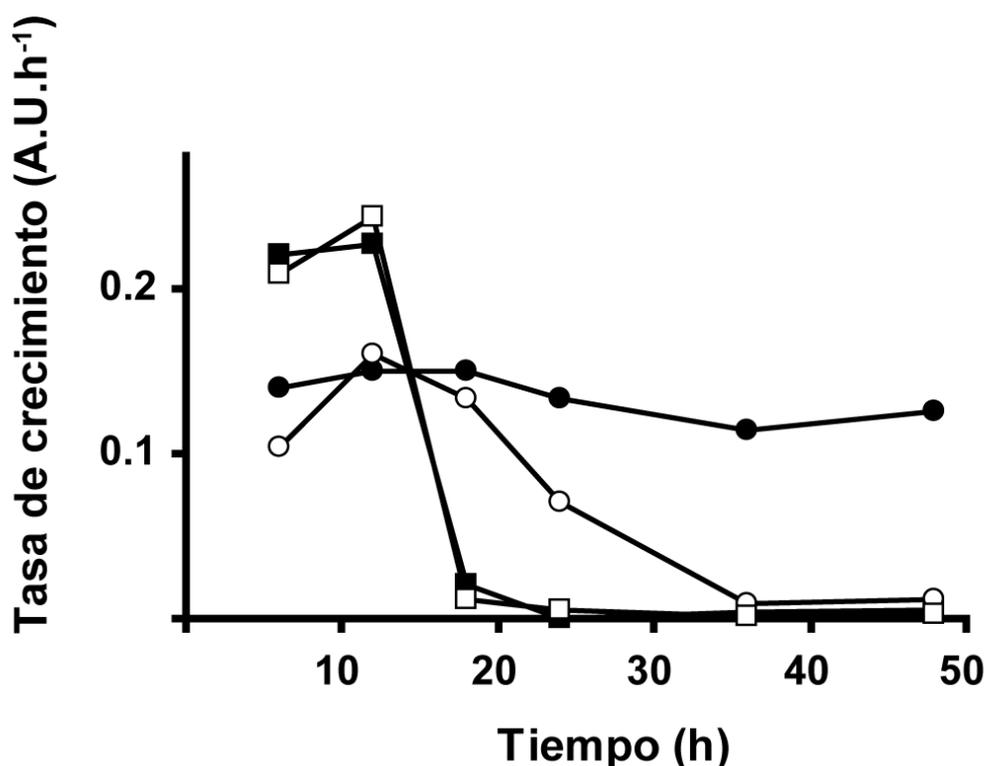


Figura 3.1.3: Tasa de crecimiento en cultivos semi-continuos de células control, SG, CR y MR. Las velocidades de crecimiento se estimaron como el incremento de la densidad óptica a 600 nm por unidad de tiempo. Leyenda; círculos negros: control, círculos blancos: MR, cuadrados negros: SG y cuadrados blancos: CR.

Con el fin de determinar si la viabilidad celular se veía afectada y en qué punto del curso temporal de la pérdida de actividad PPasa ocurría, también se analizó la capacidad de estas células para formar colonias (Figura 3.1.4). Aunque la actividad PPasa fue indetectable mucho antes, la pérdida de viabilidad se observó en las células SG y CR a las 18 h de incubación y fue a las 21h se observó el valor mínimo (aproximadamente un 27% de las células sembradas). Del mismo modo la viabilidad celular de las células MR disminuyó drásticamente tras 36 h de incubación y alcanzó un valor mínimo tras 48h de cultivo (aproximadamente un 30% de las células sembradas). Debido a que las células incubadas en condiciones MR alcanzaban niveles de viabilidad, actividad PPasa y tasa de crecimiento a periodos de incubación más largos que las células incubadas en condiciones SG y CR, en el resto de experimentos se utilizaron condiciones equivalentes entre las diferentes condiciones de cultivo. Así, en los ensayos con un único punto de tiempo, los cultivos SG y CR se analizaron a las 18h mientras que los cultivos MR se analizaron a las 36h.

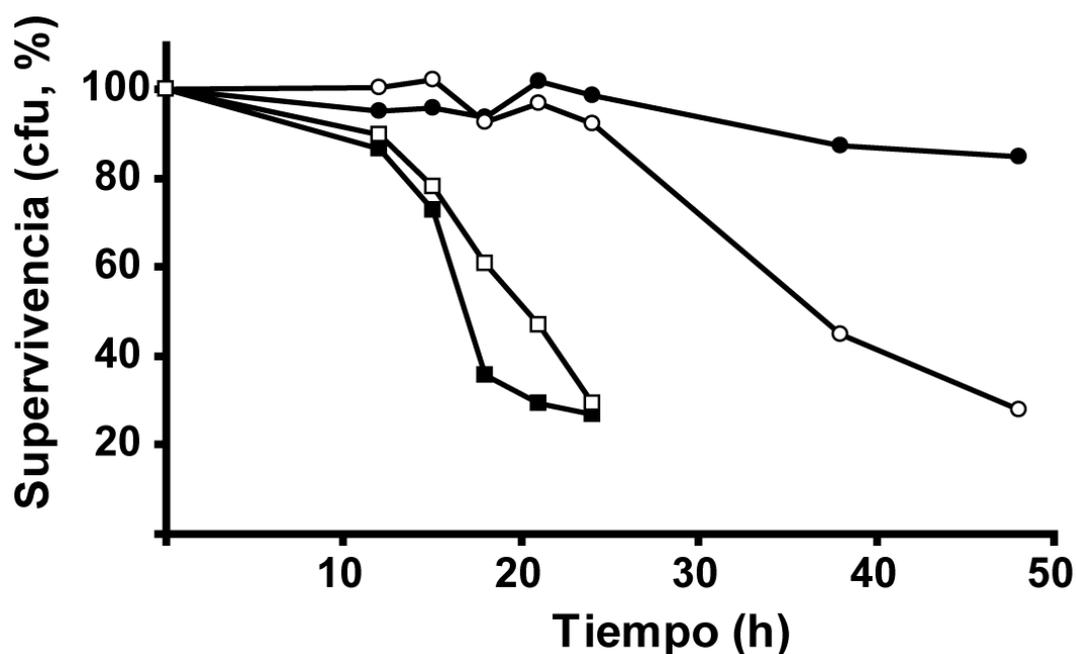


Figura 3.1.4: Capacidad de supervivencia de la cepa YPC3 en las diferentes condiciones de cultivos. La viabilidad celular se midió como la capacidad de formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs) en función de la fuente de carbono y del tiempo. Leyenda; círculos negros: control, círculos blancos: MR, cuadrados negros: SG y cuadrados blancos: CR.

3.1.2 Efecto de la deficiencia de Ipp1p en el ciclo celular

También estábamos interesados en determinar las consecuencias de incrementar los niveles de PPI sobre el ciclo celular de la levadura. Para ello se compararon los perfiles de ciclo celular de las células control, las células crecidas en condiciones SG y CR, y las células MR (Figura 3.1.5). Se observaron perfiles diferentes entre células que llevan a cabo un metabolismo fermentativo y células que respiran. En las dos condiciones en las que las células fermentan, SG y CR, las células mostraron una abrupta parada de ciclo, acompañada de la presencia de una elevada población de células presentócon un contenido de DNA inferior al que corresponde a un genoma haploide intacto ($subG_1$), una característica indicativa de muerte celular. Por el contrario, el perfil de ciclo celular en condiciones MR no presentó acumulo de células en $subG_1$, aunque si se apreció, al igual que en células SG y CR, una parada drástica de ciclo.

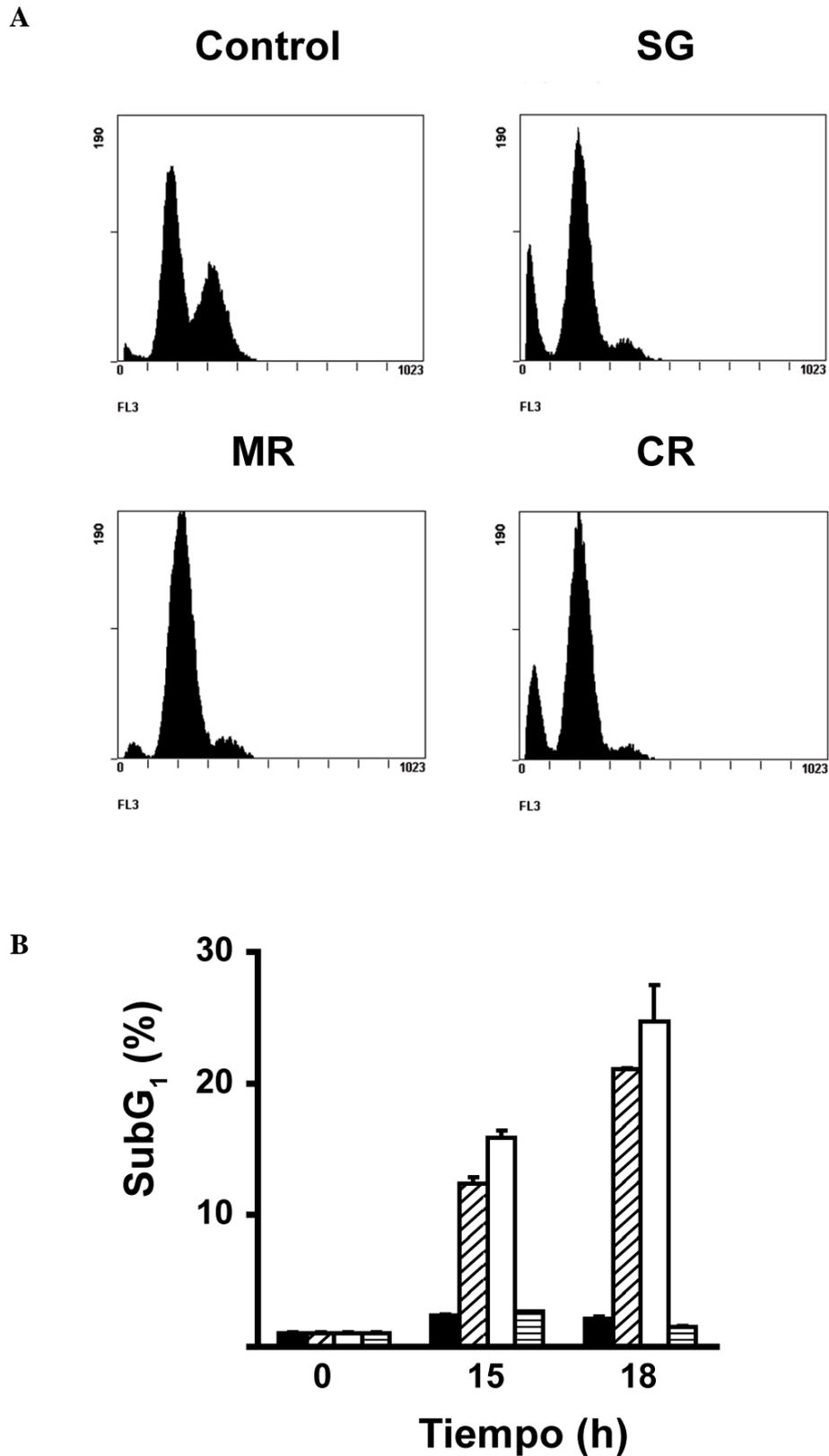


Figura 3.1.5: Análisis del ciclo celular de la cepa YPC3 en las diferentes condiciones de cultivo. A) Perfiles de ciclo celular, se analizaron mediante citometría de flujo con ioduro de propidio en células control, SG, CR y MR en cultivos con una $O.D._{600} \leq 0,5$. B) Cuantificación de la población celular en subG₁ en las diferentes condiciones de cultivo. Leyenda; barras negras: control, barras con líneas oblicuas: SG, barras blancas: CR y barras con líneas horizontales: MR.

En el caso de las células SG y CR, se observó un aumento perceptible de la población en fase subG₁ a las 18 h de incubación, llegando a representar hasta un 25% de las células en el cultivo (Figura 3.1.5). Sin embargo, en condiciones MR, no se observó ningún aumento de la población en dicha fase, respecto a las células control, incluso tras 56 h de cultivo (datos no presentados).

Debido a que el ioduro de propidio no proporciona suficiente precisión para discernir en levaduras entre una parada de ciclo celular en fase G₁ y una parada de ciclo celular en fase S, se decidió medir los niveles de RNAm de las ciclinas CLN3, CLB5 y CLB3 mediante PCR semicuantitativa como marcadores de las fases G₁, S y G₂ del ciclo celular de levaduras respectivamente (Figura 3.1.6).

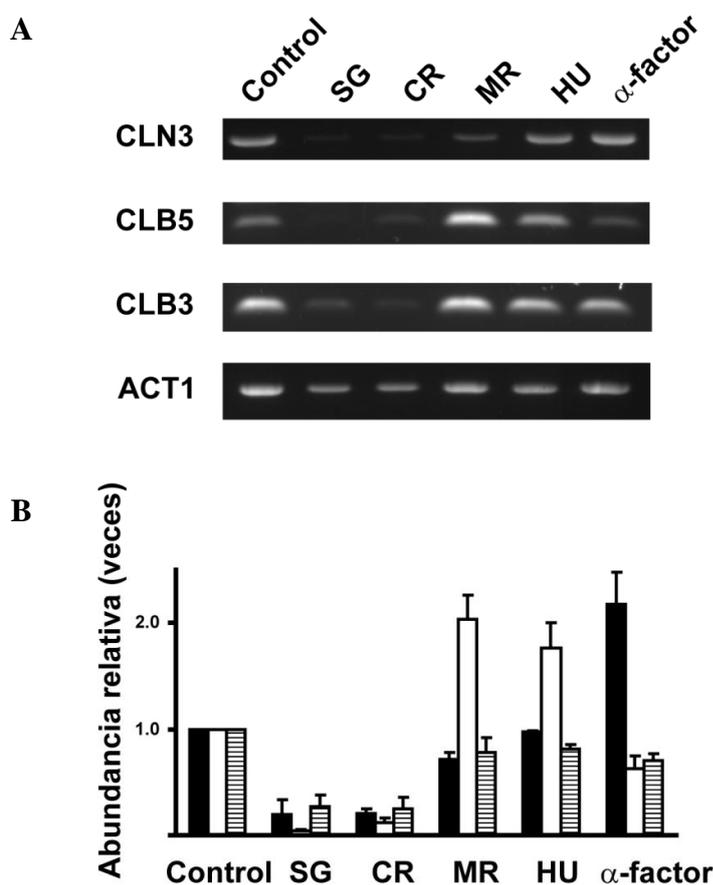


Figura 3.1.6: Niveles de ciclinas en la cepa YPC3 en función del tipo de metabolismo. A) PCR semicuantitativa, los productos se obtuvieron a partir de 1 μ l del cDNA obtenido a partir de 1 μ g del RNA total y se amplificaron con oligos flanqueantes de cada ciclina, Como control de carga se determinaron los niveles de ACT1 (actina), y como controles de parada de ciclo celular en fases S y G₁, RNA de células tratadas con hidroxurea y α -factor respectivamente. B) Cuantificación de la abundancia de ciclinas normalizada utilizando ACT1. Leyenda: barras negras: CLN3, barras blancas: CLB5 y barras con líneas horizontales: CLB3.

En ambas condiciones en las que las células llevaron a cabo un metabolismo fermentativo (células SG y CR) se observó una notable disminución de los niveles de RNAm para todas las ciclinas analizadas, una situación por lo general asociada a fase G₀ (Barbet, Schneider et al. 1996). Por su parte, las células MR presentaron una acumulación de RNAm de la ciclina CLB5 y un perfil similar al observado en células tratadas con hidroxiaurea, indicativas de una parada de ciclo celular en fase S, pero muy diferente al perfil observado en células paradas en fase G₁ mediante el tratamiento con α -factor (Figura 3.1.6).

3.1.3 Efectos celulares de la depleción de Ipp1p dependientes del tipo de metabolismo

Debido a las diferencias encontradas en el ciclo celular, se decidió observar al microscopio el aspecto de las células YPC3 crecidas en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 3.1.7 A). Mientras que las células SG y CR no presentaron yemas, si se encontraron en la mayoría de las células MR, apoyando los resultados obtenidos al medir el contenido de RNAm correspondiente a las diferentes ciclinas para cada condición de cultivo.

Sorprendentemente, las células con metabolismo fermentativo, SG y CR, mostraron una morfología característica: eran mucho más grandes que las células control y las células MR y parecían contener una gran vacuola que ocupaba la mayor parte de la célula. Cuando se cuantificó la superficie celular aparente observada para cada condición de cultivo, las células MR y las células control no mostraron diferencias estadísticamente significativas, con una superficie celular aparente de 20 μm^2 aproximadamente. Sin embargo, las células SG y CR mostraron una superficie celular aparente de 40 μm^2 aproximadamente (Figura 3.1.7 B).

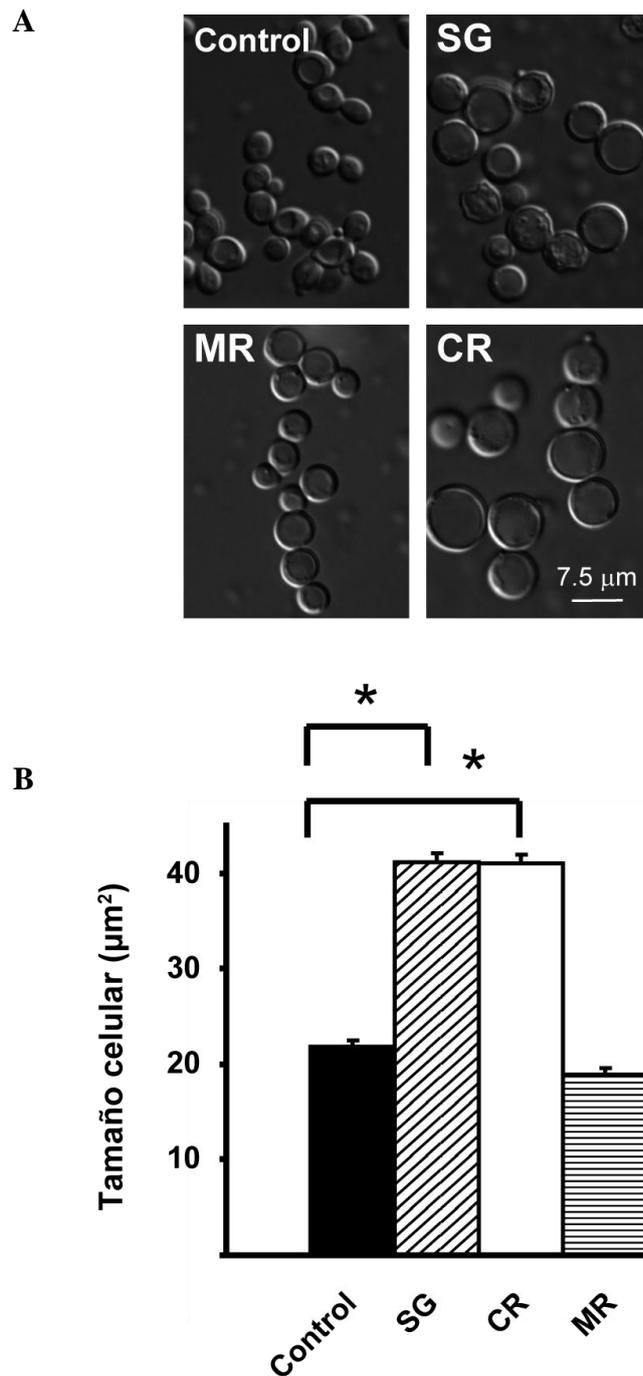


Figura 3.1.7: Tamaño celular en las diferentes condiciones de cultivo. A) Fotografías al microscopio de células control, SG, CR y MR B) Cuantificación de la superficie celular aparente como el área observada en el microscopio, los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (t-Student, $p \leq 0,05$).

Otra característica analizada fue la degradación del DNA. Observada previamente por la aparición de una población celular en fase subG₁ del ciclo celular en condiciones SG y CR, puede ser indicativa de muerte celular por apoptosis. En estos casos, cuando se somete el DNA genómico de células apoptóticas a una electroforesis

en gel de agarosa, se observa la aparición de un “laddering” característico de la fragmentación internucleosomal (Coyle, Kinsella et al. 2004). Así, se sometió a electroforesis en gel de agarosa el DNA genómico previamente extraído de las células YPC3 en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 3.1.8). Sin embargo, se observó una mancha continua en células SG y CR. Como aproximación complementaria, se optó por realizar un ensayo de TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling. En ninguna de las condiciones de cultivo se observaron células marcadas por este método.

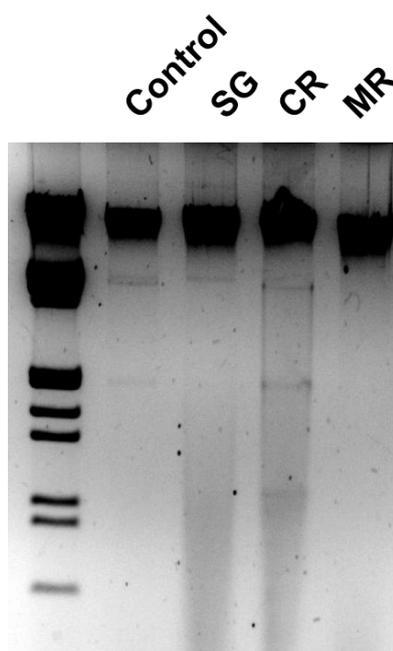


Figura 3.1.8: Electroforesis en gel de agarosa de DNA genómico extraído de células YPC3 en las diferentes condiciones de cultivo. Se cargaron 25 μ g de DNA por pocillo; en la primera calle se observa el marcador de pesos moleculares (DNA del fago lambda digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII).

La presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) es otro marcador típico asociado a muerte celular programada (Ruckenstuhl, Carmona-Gutierrez et al. 2010). Al analizar el contenido celular de ROS en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 3.1.9) mediante la tinción con dihidrorodamina-123 no se observó ningún incremento de ROS en las células SG y CR respecto a las células control. Sorprendentemente sí mostraron acumulación de ROS las células MR, fenómeno no observable en la cepa parental W303-1a crecida bajo las mismas condiciones.

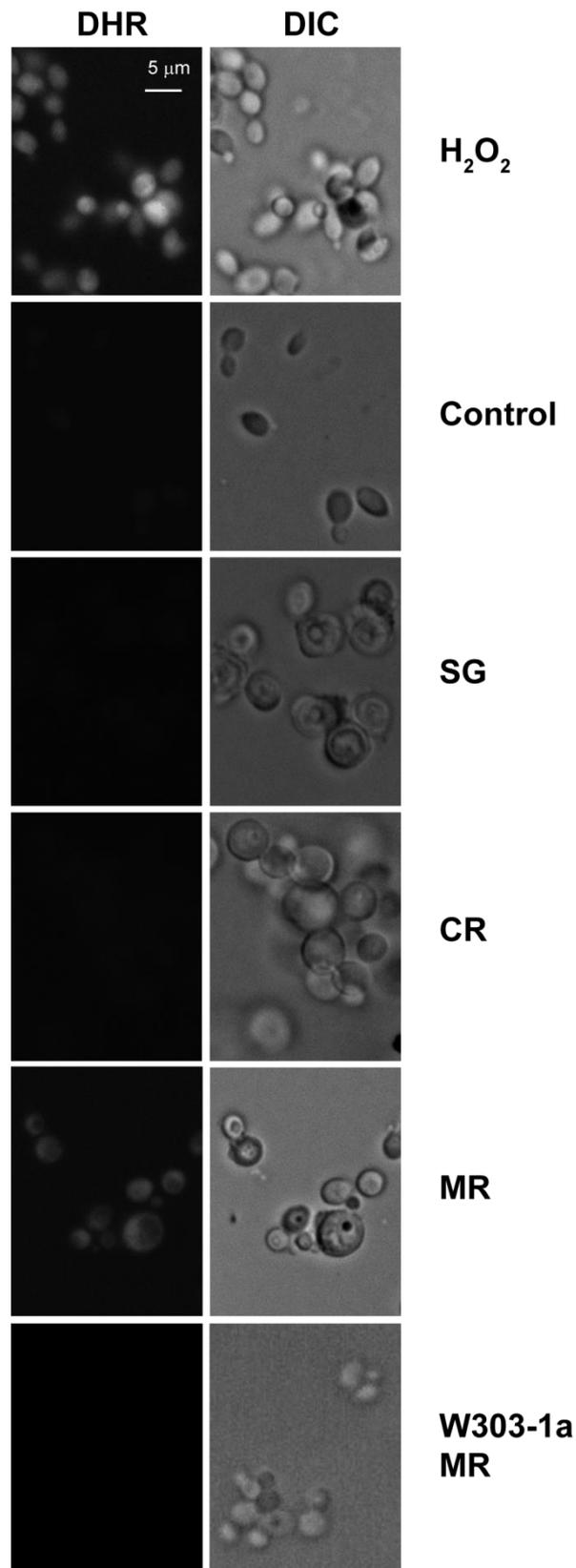


Figura 3.1.9: Acumulación de ROS en células YPC3. La presencia de especies reactivas del oxígeno fue analizada usando dihidrorodamina-123. Las células fueron teñidas con 5 $\mu g/ml$ durante 2 h en las diferentes condiciones de cultivo indicadas. Como control positivo se utilizaron células tratadas con peróxido de hidrogeno durante 3 h. W303-1a MR: control de la cepa parental cultivada en condiciones MR.

Una vez descartada la muerte celular por apoptosis y con la evidencia de vacuolización en células SG y CR observada mediante microscopía, se propuso comprobar si se había inducido autofagia en estas células. Para confirmar esta hipótesis se transformó la cepa YPC3 con la construcción GFP-ATG8, ATG8 sufre un procesamiento proteolítico detectable por *Western blot* que puede ser utilizado como marcador de inducción de autofagia (Loewith and Hall 2011). Como se muestra en la figura 3.1.10, las células control y las células MG no mostraron procesamiento de la quimera GFP-Atg8p, mientras que las células con metabolismo fermentativo presentaron una clara banda inferior de aproximadamente 30 kDa, correspondiente a la GFP liberada de la fusión. Además, en estos dos casos se aprecian bandas intermedias que podrían corresponder a la degradación parcial de la fusión GFP-Atg8p o a la lipidación de la misma, similar a lo observado en células parentales W303-1a mantenidas en hambre de nitrógeno durante 5h.

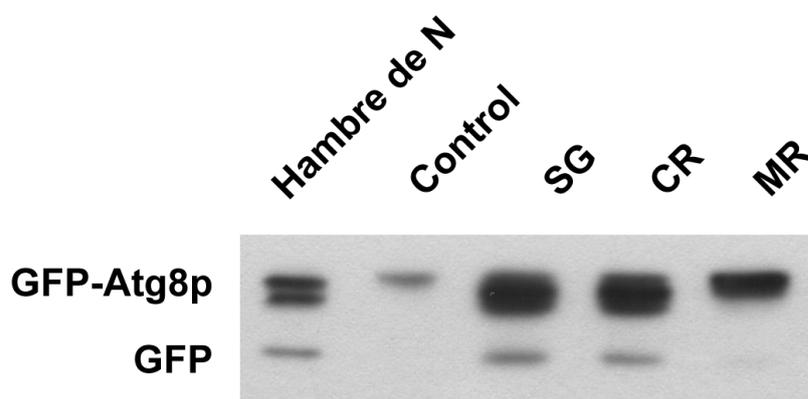


Figura 3.1.10: Autofagia en células YPC3 en función del metabolismo energético. El procesamiento de la fusión GFP-Atg8p fue detectado por *Western blot* con un anticuerpo comercial contra GFP. En cada pocillo se cargaron 50 µg de extracto celular total. Células mantenidas en hambre de nitrógeno durante 5h fueron utilizadas como control.

Como una segunda aproximación para apoyar la hipótesis de la inducción de autofagia en células SG y CR como consecuencia del exceso de PPI, se decidió utilizar el colorante vital FM4-64. Este colorante ha sido utilizado como marcador de autofagia. Tiñe membranas de vacuolas ácidas, de manera que en células autofágicas, debido a la acumulación de material de membrana en la vacuola, se observa señal tanto en la membrana como en el interior de dicho compartimento, mientras que en células en las que no se ha inducido autofagia solo se tiñe la membrana vacuolar (Journo, Winter et al.

2008). Cuando se observaron las células al microscopio tras la tinción con FM4-64 (Figura 3.1.11), se detectaron vacuolas teñidas interiormente en células SG y CR, similares a las observadas en las células mantenidas en hambre de nitrógeno. Además, la proporción de células con vacuolas teñidas interiormente (31 %) fue similar a la proporción de células en fase subG₁ del ciclo celular previamente determinada por citometría de flujo (Figura 3.1.5). Por el contrario, las células control crecidas en galactosa y las células MR no mostraron ninguna acumulación de FM4-64 en sus vacuolas y mantuvieron una morfología normal.

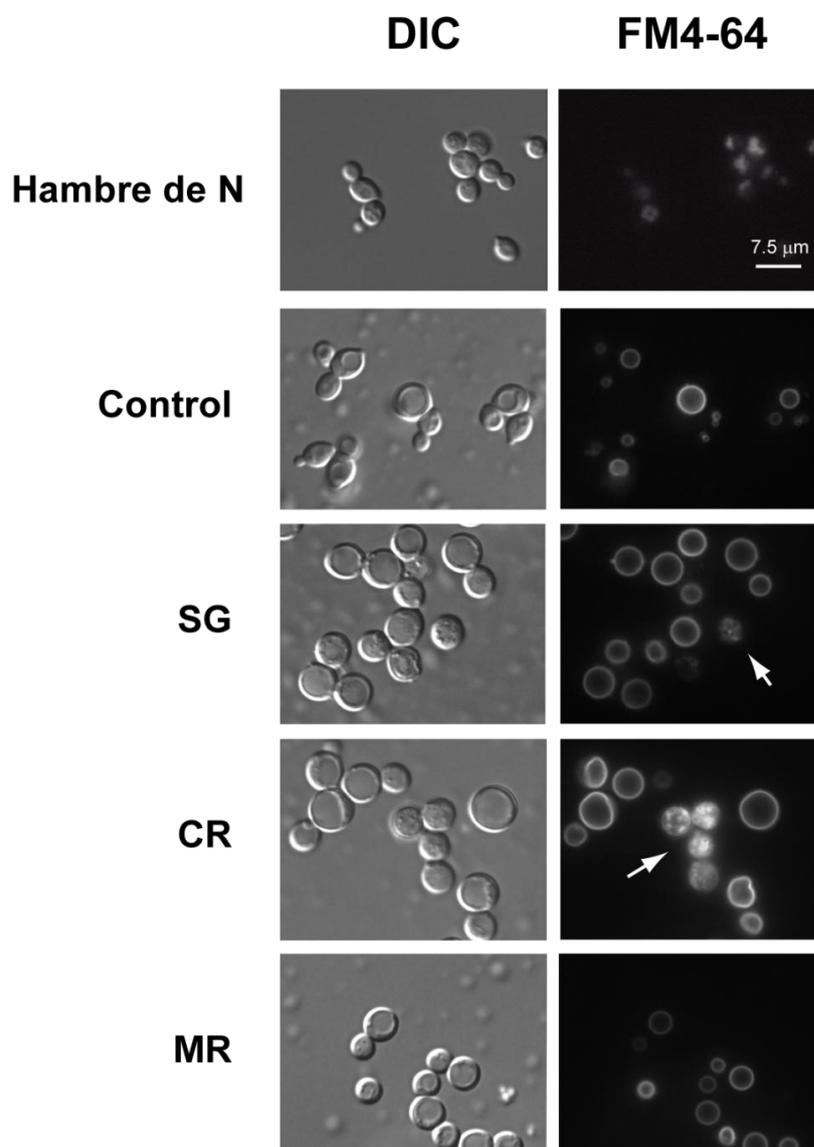


Figura 3.1.11: Acumulación de autofagosomas en vacuolas de células YPC3. Los compartimentos ácidos fueron teñidos con el colorante vital FM4-64 como se describe en (Journo *et ál.*, 2008) para las diferentes condiciones de cultivo. Células mantenidas en hambre de nitrógeno durante 5h fueron utilizadas como control.

3.1.4 Efecto del lavado del exceso de PPI y la reactivación de Ipp1p

A diferencia de las células SG y CR, las células con metabolismo respiratorio obligado (células MR) no presentaron ningún marcador de muerte celular, por lo que se decidió determinar si la parada de ciclo celular que sufrían estas células por exceso de PPI era reversible. Se optó por eliminar el exceso de PPI del medio y reactivar la PPasa lavando las células con medio fresco y galactosa como fuente de carbono tras 48h en condiciones de MR.

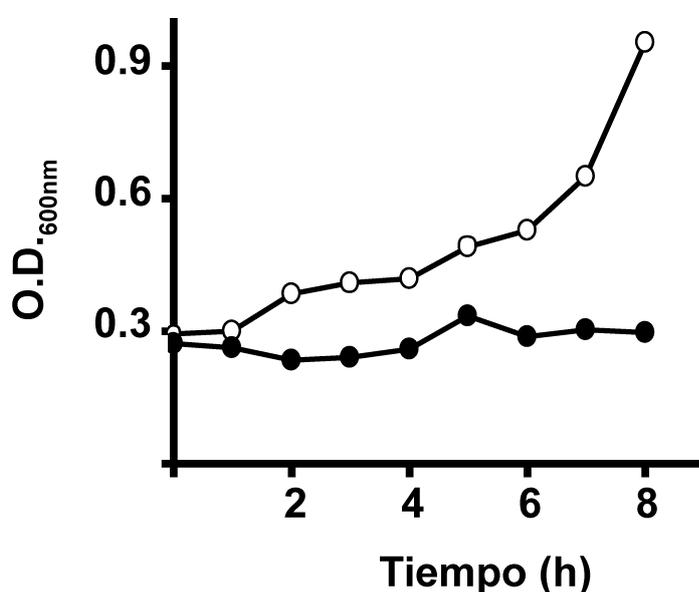


Figura 3.1.12: Tasa de crecimiento de células MR lavadas con medio fresco YPGal o YPGli. Las células fueron lavadas con medio fresco YPGal e YPGli tras 48h cultivadas en condiciones MR. Leyenda; círculos negros: células lavadas con medio YPGli, círculos blancos: células lavadas con YPGal.

Como se puede observar en la figura 3.1.12, al lavar el exceso de PPI y reactivar la sPPasa con medio fresco y galactosa como fuente de carbono, las células MR recuperaron el crecimiento determinado como incremento de O.D.₆₀₀. No obstante, este cultivo mostró una fase “lag” de aproximadamente 6h debido probablemente al tiempo necesario para que el exceso de PPI intracelular difunda al medio exterior. Por el contrario las células MR lavadas tras 48h con medio fresco pero manteniendo como fuente de carbono glicerol no mostraron aumento de proliferación, poniendo de manifiesto la necesidad de reactivar la actividad PPasa para reanudar el crecimiento celular en condiciones MR.

También se analizó la capacidad de formar colonias de estos cultivos. Para ello tras lavar las células MR con medio fresco YPGal e YPGli, se sembraron en placa con medio sólido YPGalactosa (Figura 3.1.13). Los resultados muestran un aumento de la capacidad de formar colonias en el caso del cultivo lavado con medio fresco YPGal, a diferencia de lo ocurrido en las células MR lavadas con medio fresco con glicerol como fuente de carbono.

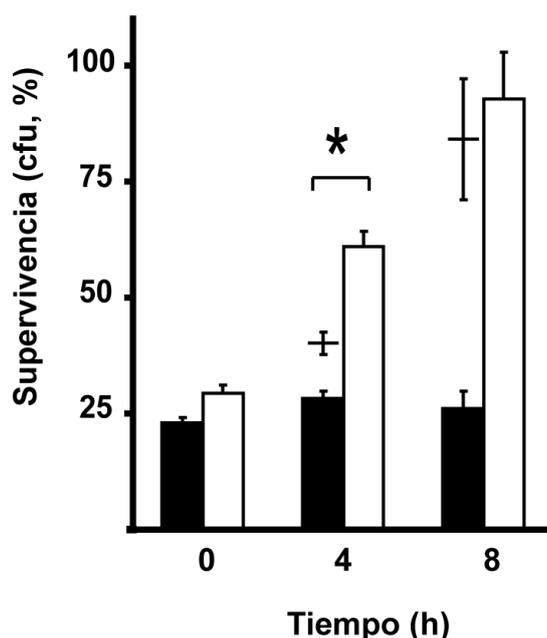


Figura 3.1.13: Capacidad de formar colonias individuales de células MR lavadas con medio fresco YPGal o YPGli a lo largo del tiempo. Las líneas horizontales muestran la capacidad de formar colonias individuales estimada si la recuperación de la viabilidad celular sólo fuese debida a las células viables a tiempo 0. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Leyenda; barras negras: células lavadas con YPGli, barras blancas: células lavadas con YPGal.

Se realizó un análisis estadístico con el fin de discernir si el incremento de la capacidad de formar colonias de las células MR lavadas con medio fresco YPGal era debido únicamente a las células viables ya presentes antes de realizar el experimento (tiempo cero) o a que, tras el lavado, se halla una población viable adicional de células que anteriormente se hallaban en forma quiescente. Fué necesario hacer las siguientes asunciones:

- 1) Distribución normal de los datos obtenidos.
- 2) Las células viables a tiempo cero son capaces de proliferar en líquido también desde ese momento.
- 3) Tanto las células viables como las no viables o las quiescentes dispersan luz de forma equivalente.

Sean V_0 , V_4 y V_t las proporciones (en porcentaje) de células viables en el cultivo a tiempo cero, a las 4 y, de forma general, a las t horas de incubación en medio YPGal. De igual forma $\Delta O.D._t$, se define como el incremento de $O.D._{600}$ del cultivo a las t horas de cultivo. De acuerdo a las asunciones mencionadas, se puede aproximar $\mu \approx \bar{x}$ y se puede estimar que, al 95% de confianza, el valor real de los parámetros medidos ha de hallarse en el rango comprendido desde $\mu - 1,96 \cdot S.E$ a $\mu + 1,96 \cdot S.E$. A tiempo cero, la proporción de células viables en el cultivo era $V_0 = 28,0 \pm 1,7 \%$. La $O.D._{600}$ inicial del cultivo fué fijada en $0,3 \pm 0,02$. Tras el lavado y 4 horas de incubación en medio YPGal fresco, el incremento en $O.D._{600}$ fue $1,43 \pm 0,12$ veces. Suponiendo que el porcentaje de células no viables se mantiene constante, que a tiempo cero es igual a $100 - V_0$ y que el total de células a tiempo t a partir de 100 células teóricas será igual a $100 \Delta O.D._t$. Se puede estimar el porcentaje teórico de células capaces de formar colonias en estos cultivos como:

$$V_t = (100 \cdot \Delta O.D._t - 100 + V_0) / \Delta O.D._t$$

$$\text{Para } V_4: (100 \cdot 1,43 - 100 + 28,0) / 1,43 = 49,7 \pm 2,4 \%$$

El rango al 95% de confianza para este caso se estima en 45,0 - 54,4 %. Sin embargo, la proporción medida directamente mediante conteo de unidades formadoras de colonias a las cuatro horas de incubación en medio YPGal fué $60,9 \pm 3,1$ y, por tanto, el rango al 95% de confianza que le corresponde es 54,8 - 67,0 %. Puesto que ambos rangos no solapan, se puede decir, al 95% de confianza, que el porcentaje de células viables medido tras cuatro horas de cultivo en YPGal no proviene únicamente de las células viables presentes al inicio del cultivo y que, por tanto, es necesaria la contribución de una población adicional de células provenientes de células aparentemente no viables a tiempo cero.

Se evaluó así mismo la capacidad de revertir su parada de ciclo mediante lavado a las células incubadas en condiciones SG y CR mediante ensayos de capacidad formadora de colonias (Figura 3.1.14). Sin embargo, la recuperación de la viabilidad celular fue exclusiva de células con metabolismo respiratorio, indicando que bajo condiciones Sg y CR la parada de ciclo celular es irreversible.

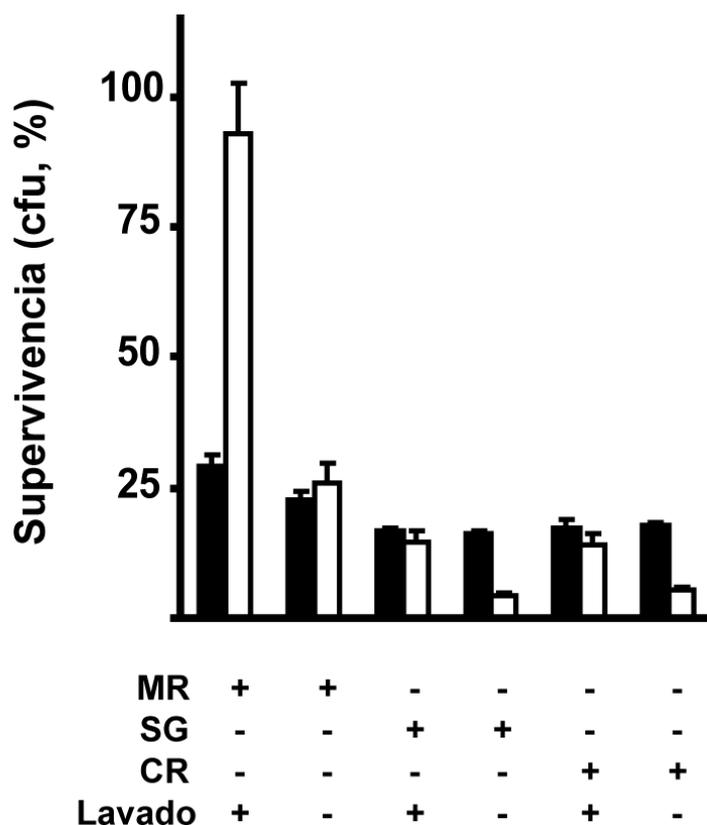


Figura 3.1.14: Irreversibilidad de la parada de ciclo celular en condiciones fermentativas. Se determinó la viabilidad para todas las condiciones de cultivo lavadas con medio fresco durante e incubadas 8h con y sin galactosa como fuente de carbono. Leyenda; barras negras: células lavadas con YPGli, barras blancas: células lavadas con YPGal.

Se decidió analizar la reanudación del ciclo de las células MR tras el lavado con el fin de determinar si ésta se realizaba de manera sincónica o asincrónica. Para ello se realizó un análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo con yoduro de propidio a lo largo del tiempo en el que las células estuvieron en medio fresco (Figura 3.1.15). Mientras que las células lavadas con medio fresco con glicerol como fuente de carbono no mostraron ninguna modificación del ciclo celular y la parada en fase S se mantuvo,

las células MR lavadas con YPGal presentaron una recuperación del ciclo celular normal de una levadura eliminando la parada en S, dando lugar a cultivos asincrónicos.

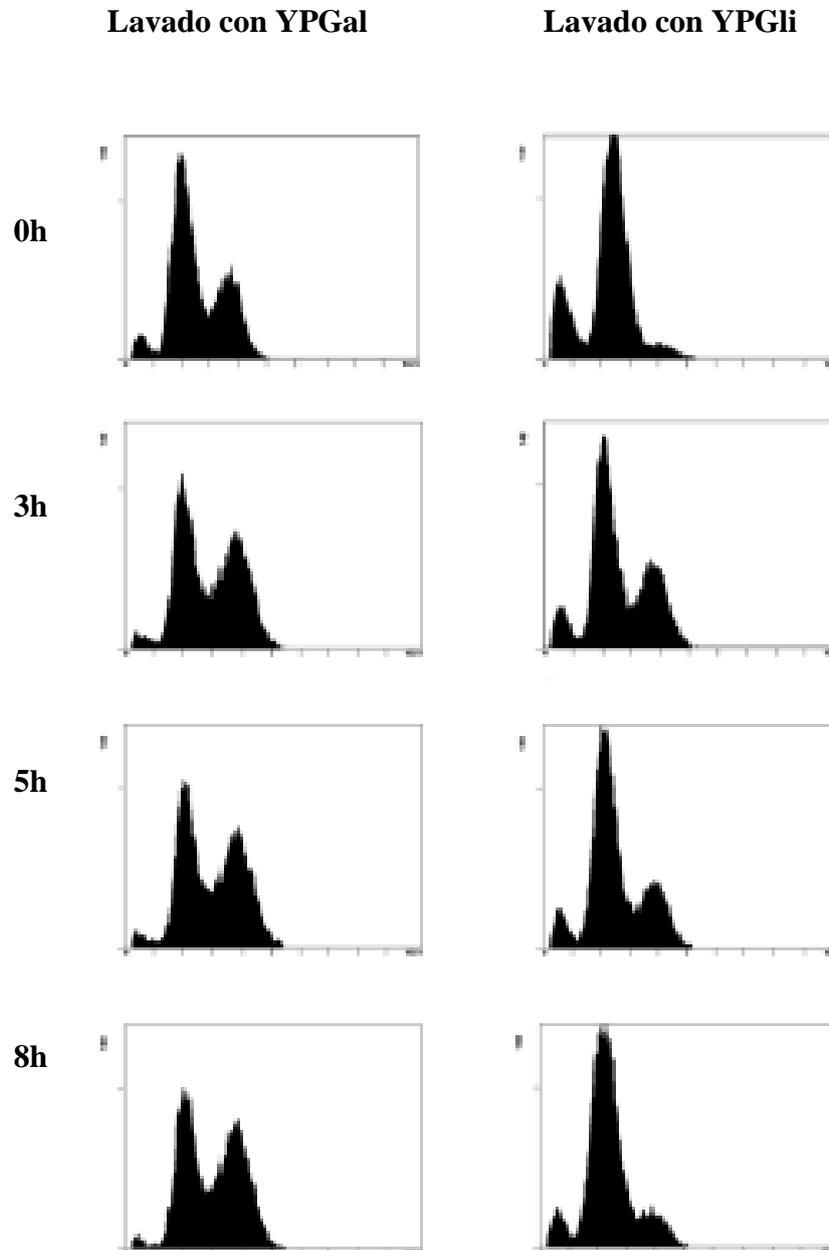


Figura 3.1.15: Reanudación del ciclo celular en células MR. Las células YPC3 se mantuvieron en condiciones de MR durante 48 h y a continuación se lavaron con medio fresco con galactosa o glicerol como fuentes de carbono. Los perfiles de ciclo celular, se analizaron mediante citometría de flujo con ioduro de propidio en cultivos con una $O.D._{600} \leq 0,5$.

3.1.5 Determinación mecanismo bioquímico que causa la muerte en células con metabolismo fermentativo

A diferencia de las células con metabolismo respiratorio, en células fermentativas la homeostasis del equilibrio NAD^+/NADH está muy limitada, debido a la carencia de mitocondrias funcionales que permitan una reoxidación alternativa de los niveles de NADH mediante el transporte de electrones durante la respiración.

Puesto que se ha probado que las reacciones de biosíntesis de NAD^+ son sensibles al exceso de PPi *in vitro* (Kornberg 1948), se planteó la hipótesis de que los niveles celulares de las coenzimas piridin nucleótido podrían verse afectados en células YPC3 bajo condiciones SG, CR y MR. Para ello se realizaron mediciones de los niveles celulares de NAD^+ y NADH en células YPC3 y W303-1a bajo las cuatro condiciones de cultivo estudiadas (Tabla V).

Tabla V: Contenido de coenzimas piridin nucleótidos en células de levadura

		Control	SG	CR	MR
W303-1a	NAD^+	1,51±0,28	1,28±0,21	1,38±0,18	1,51±0,29
	NADH	1,17±0,26	0,49±0,06	0,35±0,04	0,71±0,10
	NAD^+/NADH	1,30	2,58	3,94	2,09
YPC3	NAD^+	1,85±0,25	0,72*±0,12	0,71*±0,11	0,54*±0,11
	NADH	1,39±0,18	0,43±0,07	0,31±0,04	0,28*±0,05
	NAD^+/NADH	1,32	1,67	2,26	1,92

Datos en μmol por 10^6 células. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto a células W303-1a (t-Student, n=3).

Tras 18 h cultivadas bajo condiciones SG, CR y tras 24 h en condiciones MR se observó, en células YPC3, una disminución estadísticamente significativa de los niveles de NAD^+ respecto a células W303-1a incubadas en condiciones equivalentes. Asimismo se observó una caída de los valores de la relación NAD^+/NADH en células YPC3 SG y CR respecto a las células W303-1a crecidas en las mismas condiciones. Sin embargo, en el caso de células YPC3 con metabolismo respiratorio, esta relación NAD^+/NADH no

se vió significativamente afectada debido a una reducción de los niveles de NADH no observada en células YPC3 SG y CR.

Se ha relacionado recientemente la disminución de los niveles celulares de NAD^+ con la inducción de autofagia masiva y muerte celular en células de mamíferos (Billington, Genazzani et al. 2008). Con el fin de comprobar si el mismo mecanismo era el responsable de la inducción de muerte celular en la levadura YPC3 en condiciones fermentativas, se suplementó el medio de cultivo con 10 mM de acetaldehído. De esta manera las células pueden oxidar cantidades adicionales de NADH independientemente al proceso fermentativo. Para evaluar una eventual reversión fenotípica se analizaron la viabilidad celular, el porcentaje de células en fase subG₁ y el tamaño celular, comparando células YPC3 control con células YPC3 crecidas en condiciones CR como ejemplo de células fermentativas.

Tras el crecimiento con medio de cultivo suplementado con acetaldehído, las células CR mostraron un incremento de hasta tres veces de la capacidad para formar colonias, llegando a niveles cercanos a los obtenidos en células control (Figura 3.1.16 A). Este efecto también estuvo acompañado de una severa reducción del porcentaje de células en fase subG₁ del ciclo celular (Figura 3.1.16 B) y del tamaño celular que mostró un valor similar al obtenido para las células crecidas con galactosa como fuente de carbono (Figura 3.1.16 C).

Como segunda aproximación para comprobar que la disminución de los niveles celulares de NAD^+ por exceso de PPi es la causa de la inducción de muerte celular en células YPC3 con metabolismo fermentativo, se transformó a las levaduras con un plásmido de expresión con la secuencia del gen que codifica a la NADH oxidoreductasa *NQR1*, una proteína unida a membrana plasmática. Las células que sobreexpresan esta enzima oxidan grandes cantidades de NADH bajo condiciones fermentativas de manera dependiente a ubiquinona e independientemente a la alcohol deshidrogenasa.

Al igual que las células crecidas en medio suplementado con acetaldehído, las células sobreexpresoras de Nqr1p en condiciones CR mostraron diferencias claras en la tasa de viabilidad, la proporción de células en subG₁ y el tamaño de las células (Figura 3.1.17) respecto a células YPC3 crecidas en las mismas condiciones, apreciándose unos valores para los distintos parámetros analizados próximos a los obtenidos para las células control.

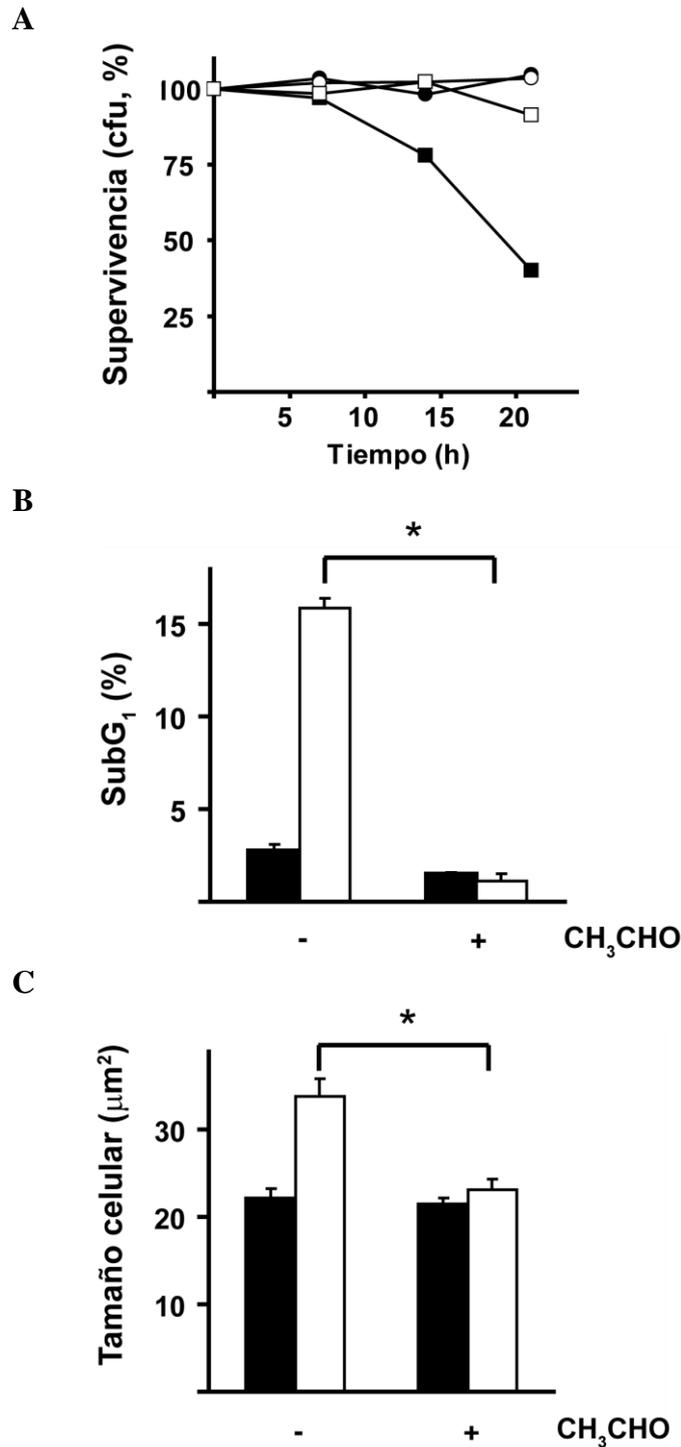


Figura 3.1.16: Alteración de parámetros celulares por incremento de los niveles de NAD⁺ utilizando acetaldehído. Las células fueron incubadas en presencia (+) y ausencia (-) de 10 mM de acetaldehído (CH₃CHO) en condiciones control y CR. A) Capacidad de formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs). Círculos blancos: control con CH₃CHO, círculos negros: CR con CH₃CHO, cuadrados blancos: control sin CH₃CHO, cuadrados negros: CR sin CH₃CHO. B) Porcentaje de células en fase subG₁ respecto a la población total, determinado mediante citometría de flujo con ioduro de propidio. Barras negras: control, barras blancas: CR. C) Superficie celular aparente observada al microscopio y expresada en μm². Leyenda igual que en B.

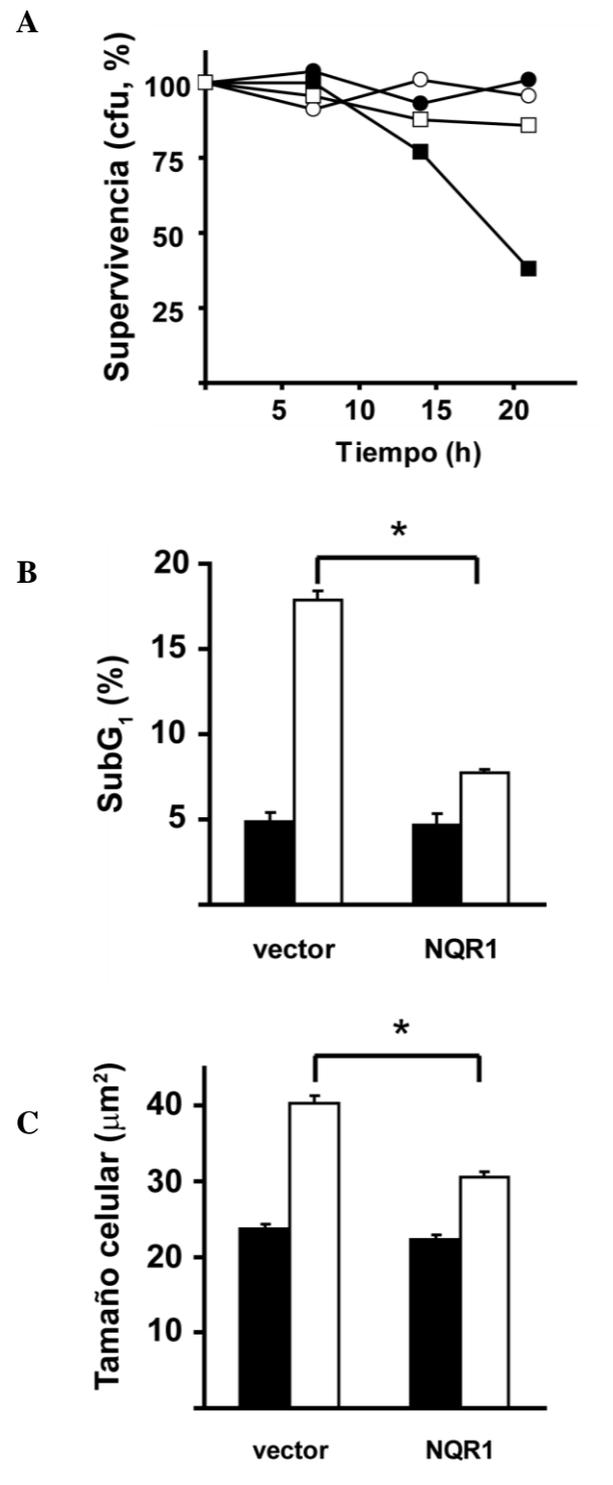


Figura 3.1.17: Alteración de parámetros celulares por incremento de los niveles de NAD^+ mediante sobreexpresión de *Nqr1p*. Las células transformadas con un vector de expresión vacío (vector) o con un vector de expresión con el gen *NQR1* (NQR1) fueron crecidas en condiciones control y CR. A) Capacidad de formar colonias a partir de células individuales. Círculos blancos: control con NQR1, círculos negros: CR con NQR1, cuadrados blancos: control con vector, cuadrados negros: CR NQR1. B) Porcentaje de células en fase subG₁. Barras negras: control, barras blancas: CR. C) Superficie celular aparente (μm^2). Leyenda igual que en B.

3.1.6 Determinación del mecanismo de muerte celular generado por el exceso de PPI en células con metabolismo fermentativo

Se ha demostrado que la autofagia es un proceso celular que, bajo ciertas circunstancias, puede convertirse en un mecanismo de muerte celular (Portt, Norman et al. 2011). Por esta razón, se decidió investigar la participación de la autofagia en la inducción de muerte celular en las células YPC3 con metabolismo fermentativo.

Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron dos cepas fondo YPC3 afectadas en su capacidad para completar el proceso autofágico. En una de ellas se ha deletado el gen VPH1 (SAH6), que codifica para una subunidad transmembrana de la V-ATPasa vacuolar. Esta bomba es necesaria para la acidificación de la vacuola, y se ha demostrado que es fundamental para finalizar el proceso de autofagia (Nakamura, Matsuura et al. 1997). La otra cepa utilizada, YPC3 atg8 Δ (SAH17), está afectada en su capacidad para inducir la autofagia, ya que la proteína atg8 es fundamental para inducir la formación del autofagosoma (Kim, Huang et al. 2001), y por tanto está afectada en las fases iniciales de la autofagia. Para evaluar una eventual reversión fenotípica se analizaron la viabilidad celular, el porcentaje de células en fase subG₁ y el tamaño celular, comparando células YPC3 control con células YPC3 crecidas en condiciones SG como ejemplo de células fermentativas.

Tanto la cepa carente de Atg8p como la cepa desprovista de actividad V-ATPasa vacuolar no mostraron pérdida de viabilidad celular cuando se sometieron a condiciones SG (Figuras 3.1.18 A y 3.1.19 A). Además, en estas condiciones, ambas presentaron niveles reducidos de células en fase subG₁ (Figuras 3.1.18 B y 3.1.19 B), así como tamaños celulares menores, similares a los de las células control en galactosa (Figuras 3.1.18 C y 3.1.19 C). De esta manera se puede postular que la autofagia es el mecanismo de muerte celular generado por el exceso de PPI en células con metabolismo fermentativo.

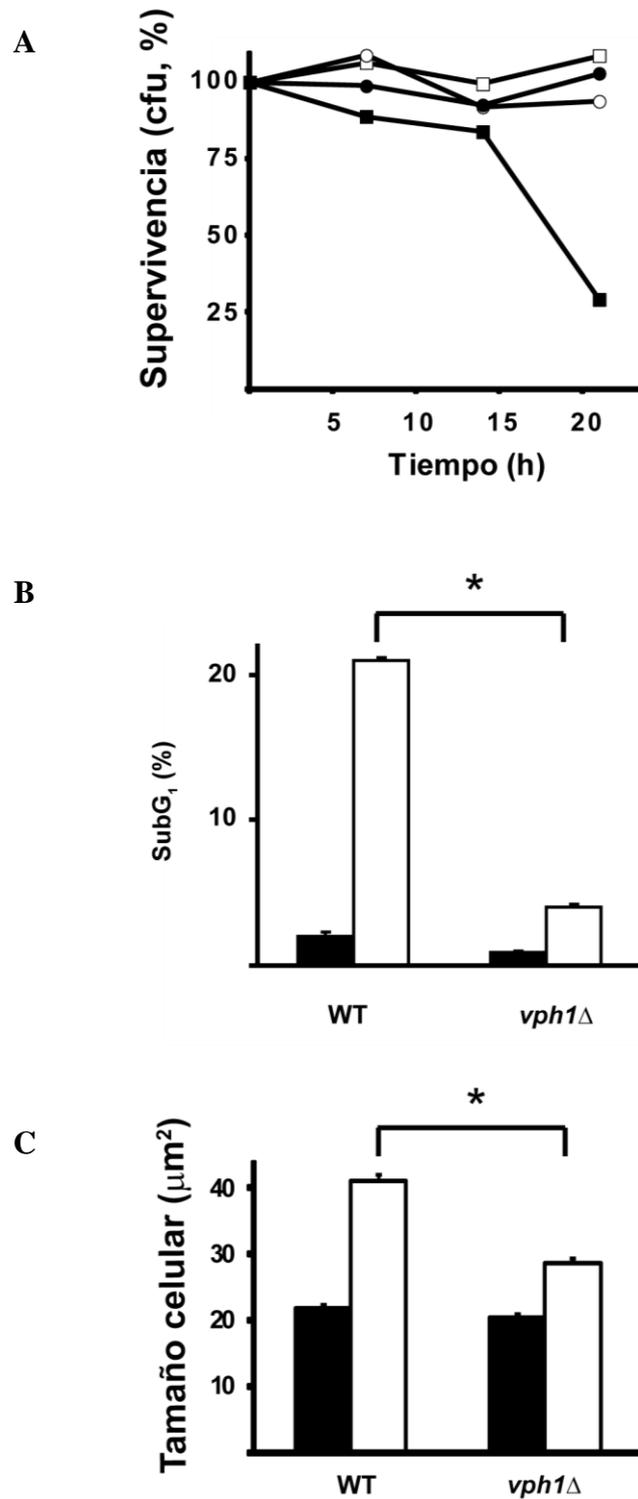


Figura 3.1.18: Efectos celulares del bloqueo de las últimas fases de la autofagia en la muerte por exceso de PPI. El mutante *vph1Δ* se obtuvo bajo fondo YPC3, y las células fueron cultivadas durante 18 h en condiciones control y condiciones SG. A) Capacidad de formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs). Círculos blancos: control *vph1Δ*, círculos negros: CR *vph1Δ*, cuadrados blancos: control silvestre, cuadrados negros: CR silvestre. B) Porcentaje de células en fase subG₁ respecto a la población total, determinado mediante citometría de flujo con yoduro de propidio. Barras negras: control, barras blancas: CR. C) Superficie celular aparente observada al microscopio y expresada como μm^2 . Leyenda igual que en B.

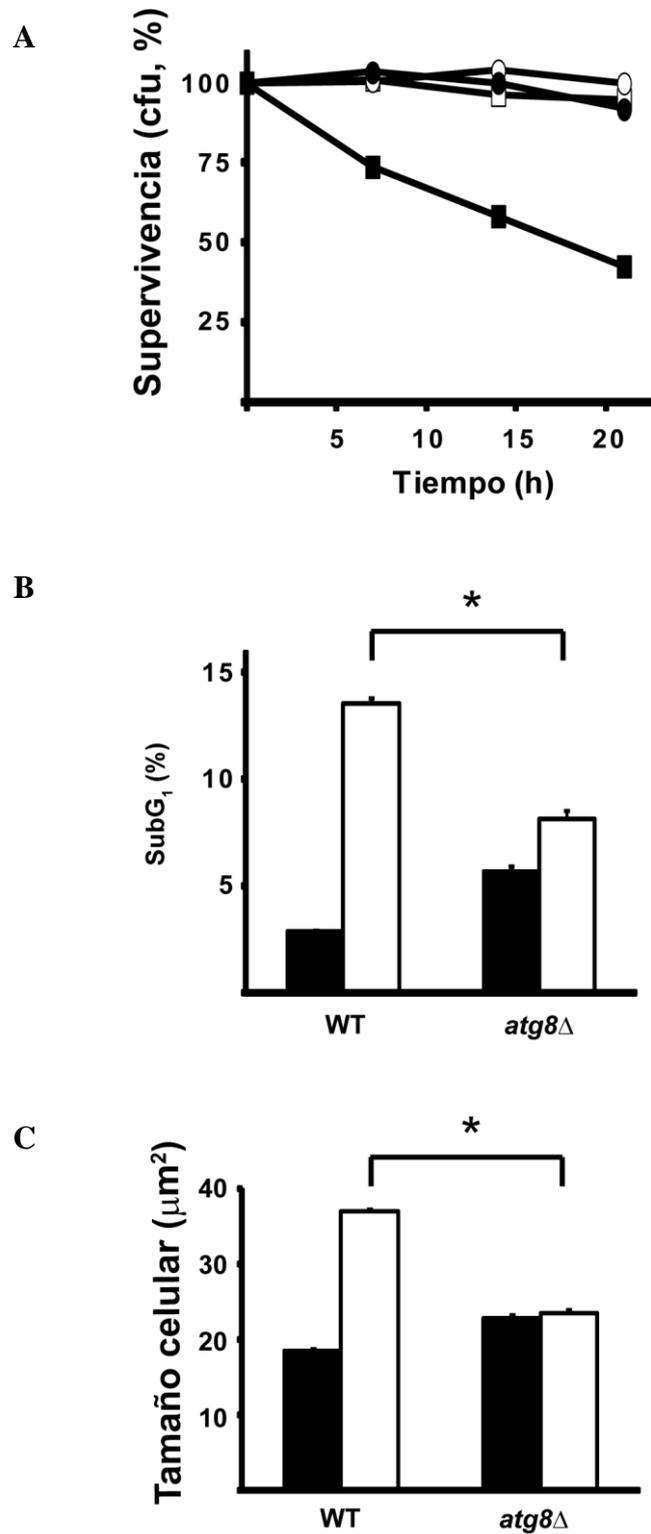


Figura 3.1.19: Efectos celulares del bloqueo las fases iniciales de la autofagia en la muerte por exceso de PPI. El mutante *atg8Δ* se obtuvo a partir de la cepa SAH16, y las células fueron cultivadas durante 18 h en condiciones control o SG. A) Capacidad de formar colonias a partir de células individuales. Círculos blancos: control *atg8Δ*, círculos negros: CR *atg8Δ*, cuadrados blancos: control silvestre, cuadrados negros: CR silvestre. B) Porcentaje de células en fase subG₁. Barras negras: control, barras blancas: CR. C) Superficie celular aparente (μm^2). Leyenda igual que en B.

3.2 Implicaciones moleculares y celulares de la localización núcleo-citosólica de la sPPasa Ipp1p de *Saccharomyces cerevisiae*

Los eucariotas no fotosintéticos carecen de H^+ -PPasas, por lo que los niveles de PPi intracelular están regulados exclusivamente por sPPasas, siendo las más estudiadas, las sPPasas de *S. cerevisia*. En este organismo existen dos sPPasas: Ipp1p, la sPPasa mayoritaria de localización citosólica, e Ipp2p, de localización mitocondrial. No existen, hasta la fecha, trabajos específicos que demuestren la presencia de PPasas en compartimentos nucleares. Hasta el momento sólo se ha demostrado la presencia de una sPPasa nuclear en *Drosophila melanogaster*, formando parte del complejo remodelador de la cromatina NURF (Gdula, Sandaltzopoulos et al. 1998).

3.2.1 Localización subcelular y niveles de expresión de la sPPasa Ipp1p en *Saccharomyces cerevisiae*

Existen en el compartimento nuclear numerosos procesos celulares generadores de PPi, como son, entre otros, la síntesis de DNA o RNA, y que podrían generar excesos de este metabolito que podrían afectar a estas mismas reacciones. Por otro lado, se cree que la presencia de PPi es esencial para otras reacciones nucleares como por ejemplo la pirofosforólisis catalizada por la DNA polimerasa (Vaisman, Ling et al. 2005). La existencia de estas reacciones nucleares influenciadas por los niveles de PPi, nos llevó a pensar que debería existir una importante regulación de estos en dicho compartimento.

Debido a la carencia de estudios relacionados con la localización subcelular de Ipp1p, se decidió dilucidar esta cuestión. Para ello, como estudio preliminar, se realizó un aislamiento de fracciones nucleares y citosólicas de células W303-1a y un posterior análisis tanto de niveles de actividad sPPasa como de proteína Ipp1p en dicho compartimento.

Como se puede observar en los paneles A y B de la figura 3.2.1, la proteína Ipp1p está presente tanto en la fracción nuclear como en la fracción citosólica. Aunque, sorprendentemente, tanto los niveles de proteína, como la actividad PPasa son significativamente diferentes en cada fracción, siendo estos valores mucho menores en el compartimento nuclear.

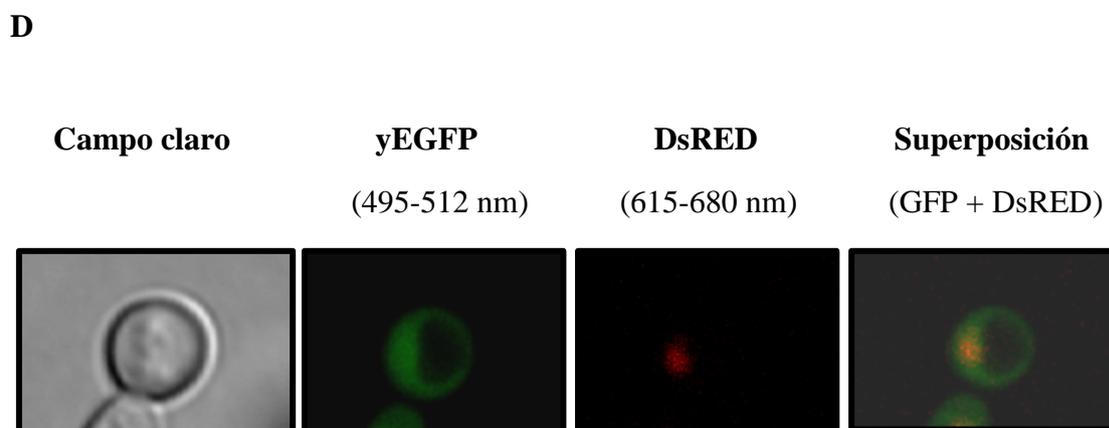
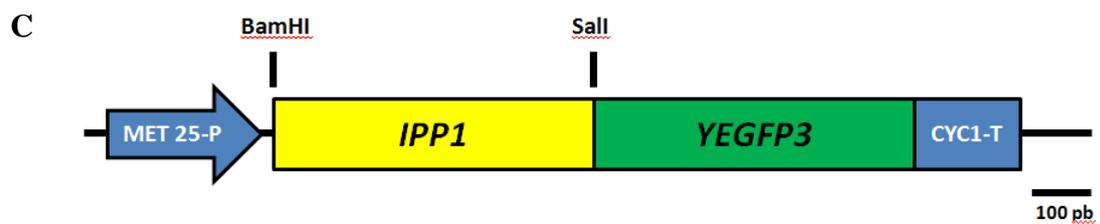
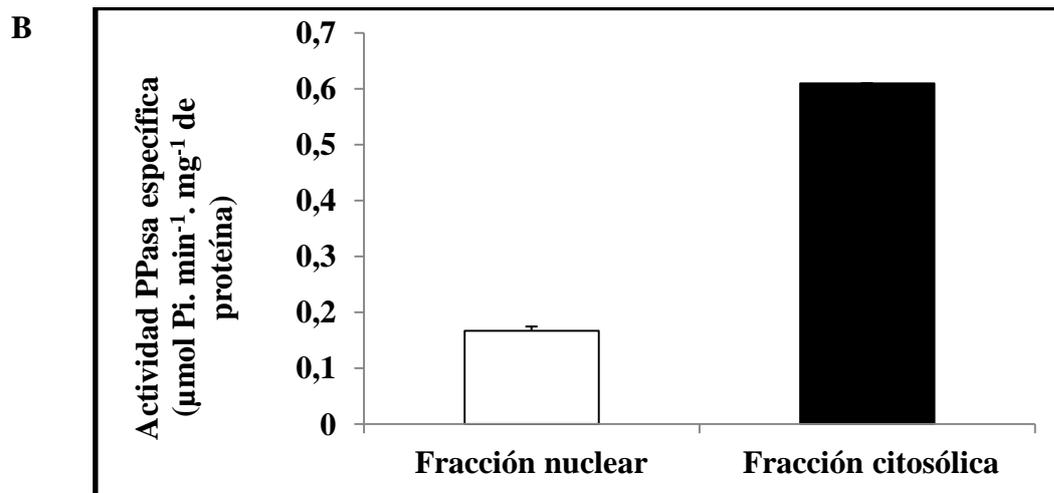
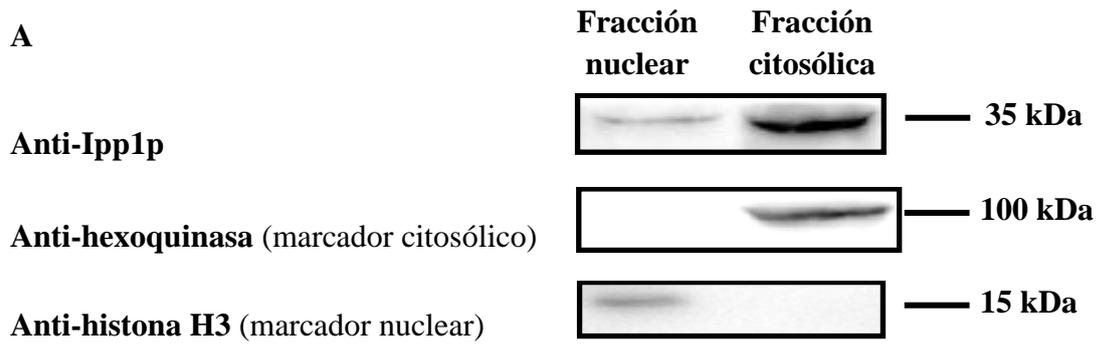


Figura 3.2.1: Niveles de proteína y actividad específica de Ipp1p en fracciones nuclear y citosólica, representación esquemática de la construcción con la quimera Ipp1p-yEGFP y localización subcelular de Ipp1p. A) Los niveles de Ipp1p se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo producido contra la sPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. En cada pocillo se cargaron 50 µg de extractos celulares. Como control del aislamiento de las fracciones nuclear y citosólica se utilizaron anticuerpos producidos contra la proteína histona H3 (fracción nuclear) y contra la proteína hexoquinasa (fracción citosólica). B) Actividad específica de liberación de fosfato a partir de PPi en extractos nucleares y citosólicos. C) Construcción control, ORF del gen *IPP1* fusionada al gen que codifica para la proteína yEGFP. D) Imágenes de microscopía de fluorescencia de la cepa control que expresa la quimera IPP1-yEGFP. Leyenda; Met25-P: promotor del gen Met25, CYC-1: terminador del gen CYC1, *IPP1*: ORF del gen IPP1, YEGFP: ORF del gen YEGFP, aparecen señalados los dos sitios de corte de restricción utilizados para generar la construcción (BamHI y Sall).

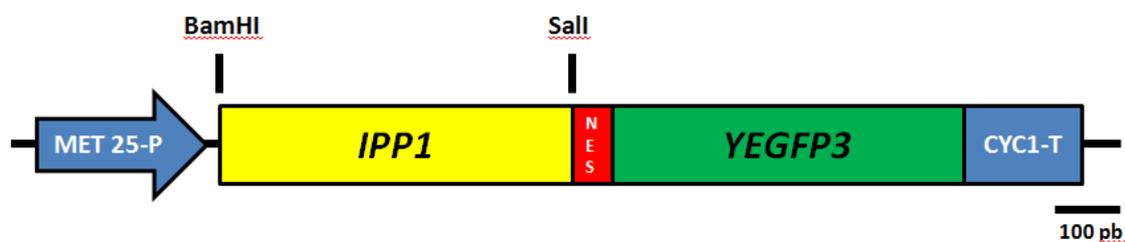
Como segunda comprobación de la localización núcleo-citosólica de Ipp1p en levaduras, se decidió observar bajo el microscopio la distribución *in vivo* de la sPPasa. Para ello, se generó una cepa bajo fondo YPC3 que expresaba la quimera IPP1-yEGFP, cepa control, en la que la localización subcelular de Ipp1p es fácilmente detectable mediante microscopía de fluorescencia. Se originaron fusiones traduccionales entre la región 3' de *IPP1* y la ORF de la proteína verde fluorescente yEGFP (Figura 3.2.1 C). Para marcar el compartimento nuclear la cepa fue co-transformada con una construcción en la que se fusionó el gen que codifica para la proteína fluorescente roja DsRED a la señal de importación al núcleo del antígeno T del virus SV40. Las fotografías muestran que Ipp1p está presente *in vivo* tanto en el compartimento nuclear como en el citosólico de la levadura (Figura 3.2.1 D).

3.2.2 Generación de cepas con Ipp1p compartimentalizada en núcleo o citosol

Demostrada la presencia de Ipp1p en las fracciones citosólica y nuclear, y debido a la falta de datos sobre la importancia molecular y celular de la localización de la sPPasa, se decidió generar cepas, del mismo modo que la cepa control, en las que se confinara Ipp1p en núcleo o en citosol. Se generaron fusiones traduccionales entre la región 3' de *IPP1* y la ORF de la proteína verde fluorescente yEGFP, para comprobar la localización subcelular de la proteína quimérica resultante. Además, para dirigir selectivamente Ipp1p al compartimento nuclear utilizó la señal de importación al núcleo monopartita (NLS, Nuclear Localization Signal: PKKKRKV) del antígeno T del virus SV40 (IPP1-NLS), mientras que para confinar dicha sPPasa en el citosol se fusionó *IPP1* a la señal de exclusión nuclear rica en leucinas (NES, Nuclear Exclusion Signal: LQLPPLERLTL) de la proteína rev del virus HIV-1 (IPP1-NES) (Cyert 2001). En

ambos casos se situaron dichas secuencias en la región 3' de *IPP1*. (Figura 3.2.2). En todos los casos la expresión es dependiente del promotor del gen MET25.

A



B

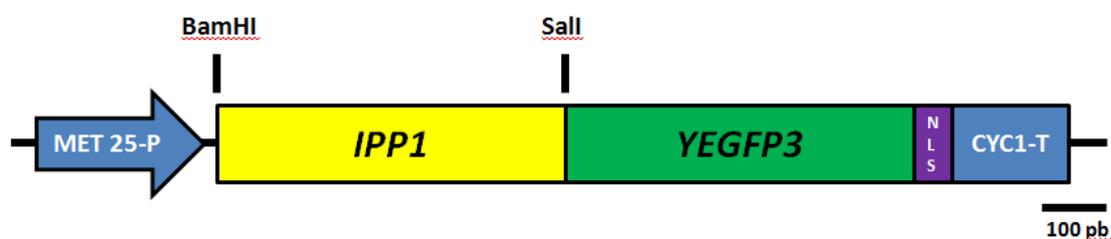


Figura 3.2.2: Representación esquemática de las construcciones génicas con yEGFP y los motivos NLS y NES, utilizadas para confinar a la sPPasa mayoritaria de levadura Ipp1p en el núcleo o el citosol, respectivamente. A) Construcción IPP1-NES, el gen *IPP1* fusionado a la señal de exclusión nuclear de la proteína rev del HIV-1, LQLPPLERLTL. B) Construcción IPP1-NLS, fusión del gen que codifica para la sPPasa a la señal de importación al núcleo del antígeno T del virus SV40, PKKKRKV. En todos los casos *IPP1* se fusiona a la ORF de YEGFP3 en el extremo 3' y la expresión está regulada por el promotor del gen MET25. Leyenda; Met25-P: promotor del gen Met25, CYC-1: terminador del gen CYC1, *IPP1*: ORF del gen *IPP1*, YEGFP: ORF del gen YEGFP, aparecen señalados los dos sitios de corte de restricción utilizados para generar la construcción (BamHI y Sall).

Estas construcciones fueron introducidas en el mutante YPC3 con el fin de evitar interferencias con Ipp1p endógena, por lo que previo a cualquier análisis, estas cepas transformantes se cultivaron en medios con glucosa como fuente de carbono durante al menos 12 h. Las células fueron visualizadas bajo el microscopio de fluorescencia, para analizar la distribución núcleo-citosólica de Ipp1p en las diferentes cepas (Figura 3.2.3). Para marcar el compartimento nuclear, al igual que en la cepa control, las cepas fueron co-transformadas con la construcción que expresa la fusión DsRed-NLS. Como muestran las fotografías al microscopio de fluorescencia, la cepa en la que *IPP1* está fusionado a la NES, presentó el patrón de expresión esperado: Ipp1p localizada

exclusivamente en el citosol. De la misma forma la distribución de la sPPasa fusionada a la NLS fue únicamente nuclear.

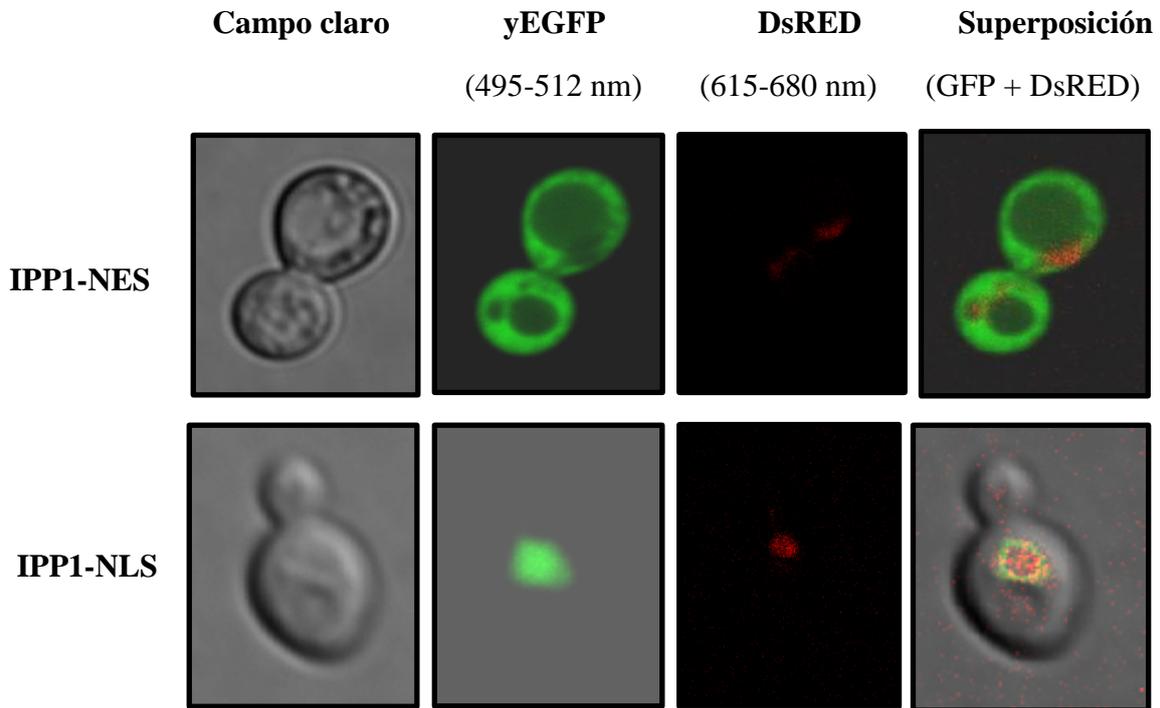


Figura 3.2.3: Localización subcelular de Ipp1p en las diferentes cepas. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células que expresan las construcciones IPP1-NES e IPP1-NLS. Imágenes adquiridas por el microscopio de fluorescencia Leica DM 6000B.

Al igual que se hizo con la cepa silvestre W303-1a, se aislaron las fracciones nucleares y citosólicas de las diferentes cepas estudiadas (control, IPP1-NES e IPP1-NLS) y se determinó tanto la actividad específica sPPasa como el nivel de proteína mediante *Western blot* en cada compartimento (Figuras 3.2.4 y 3.2.5). En el caso de la cepa control, al igual que lo obtenido para la cepa silvestre W303-1a, los niveles tanto de proteína como de actividad específica sPPasa, fueron inferiores en núcleo respecto a citosol. Por su parte, en la cepa IPP1-NES, aunque no se redujo la expresión de Ipp1p en el compartimento nuclear, sí se observó un importante aumento en el citosol al compararlos con los niveles obtenidos para la cepa control. Finalmente, la cepa IPP1-NLS mostró un tímido aumento, tanto de los niveles de proteína como de actividad sPPasa específica, en el compartimento nuclear respecto al control. Por el contrario, estos niveles disminuyeron en el compartimento citosólico. En cualquier caso, el nivel de actividad sPPasa nuclear se mantuvo siempre bajo. También se observó en el *Western blot*, como Ipp1p en la preparación nuclear de la cepa IPP1-NLS presentó un

patrón de heterogeneidad de bandas (2-3 bandas de proteínas muy cercanas), lo que sugiere una posible modificación post-traducciona de la sPPasa.

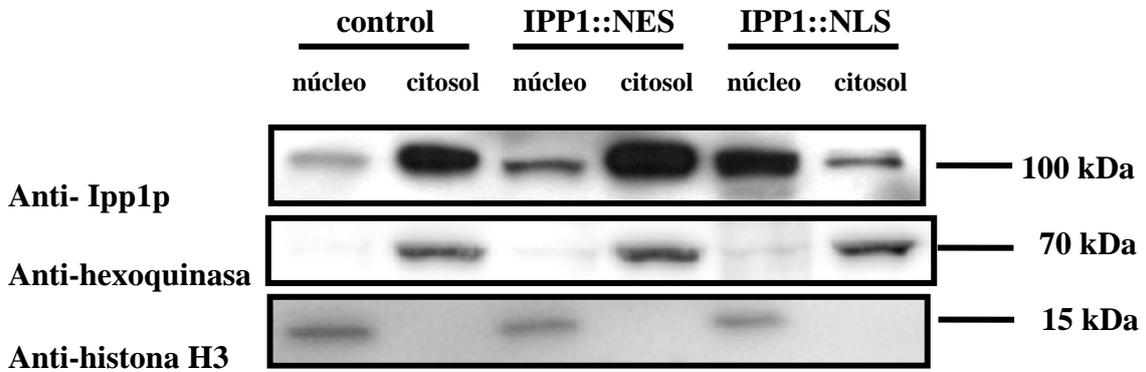


Figura 3.2.4: Niveles de proteína Ipp1p (quimeras con yEGFP) en extractos citosólicos y nucleares de las diferentes cepas transformantes. Los niveles de las proteínas quiméricas se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo producido contra la proteína GFP. La pureza de las preparaciones obtenidas se confirmó mediante *Western blots* con anticuerpos contra hexoquinasa e histona H3 como proteínas marcadoras para las fracciones citosólica y nuclear respectivamente. En cada pocillo se cargaron 50 μg de extractos celulares.

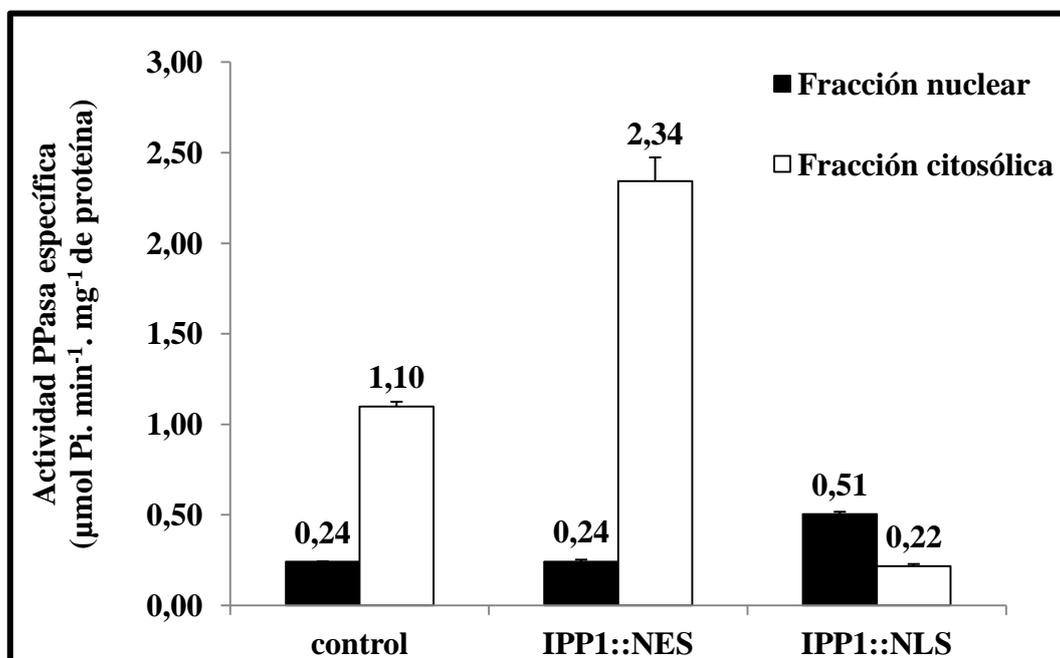


Figura 3.2.5: Niveles de actividad específica sPPasa de las fracciones nucleares y citosólicas de las cepas transformantes. Actividad específica de liberación de fosfato a partir de PPI en extractos nucleares y citosólicos de las diferentes cepas.

3.2.3 Complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p en función de la localización subcelular de la sPPasa

Con el fin de determinar si el confinamiento de Ipp1p en el compartimento nuclear o en el citosol afectaba a la viabilidad celular de la levadura, se realizó un ensayo típico de goteo (Figura 3.2.6). Se cultivaron las células en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono hasta saturación y a continuación se transfirieron a glucosa durante 12h para reprimir el promotor GAL1 y así depletar a la célula de Ipp1p endógena. Como control negativo se utilizó el mutante YPC3 sin transformar y como control positivo células silvestres W303-1a, ambas cultivadas en las mismas condiciones. Los goteos se realizaron por duplicado en placas de medio rico con glucosa o galactosa como fuente de carbono. Los resultados muestran que ambas quimeras son funcionales y capaces de complementar la deficiencia en Ipp1p de la cepa YPC3 crecida en glucosa, independientemente del confinamiento de estas quimeras en los compartimentos nuclear (IPP1-NLS) ó citosólico (IPP1-NES). Demostrando que el confinamiento de Ipp1p no afecta a la viabilidad celular de la levadura.

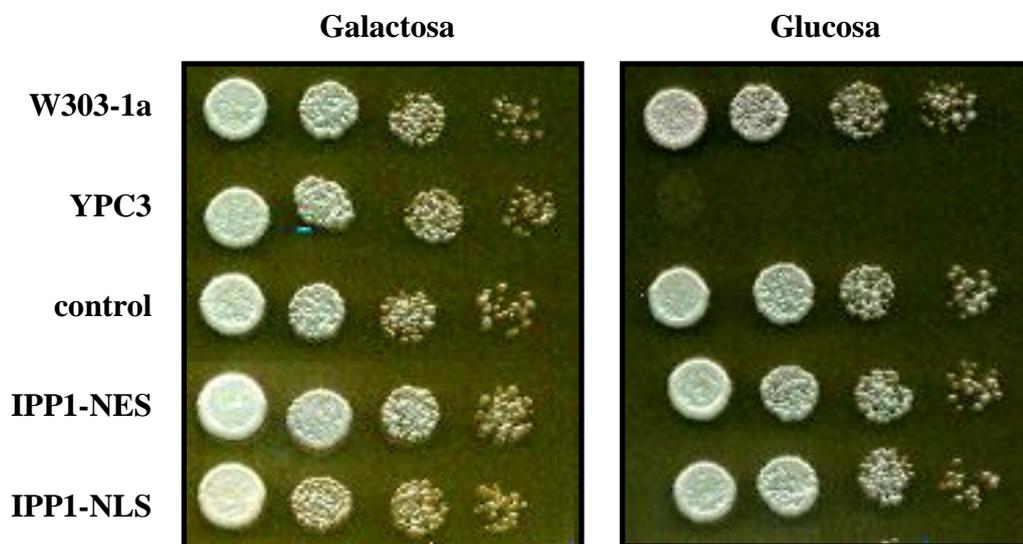


Figura 3.2.6: Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 (medio con glucosa) por sPPasas quiméricas de distinta localización subcelular usadas en este trabajo. Crecimiento comparativo en galactosa y glucosa de las distintas cepas. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre placas con glucosa ó galactosa, correspondientes (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células, respectivamente.

Sin embargo, se ha constatado, mediante el seguimiento temporal de la O.D.₆₀₀ de cada cultivo, que la tasa de crecimiento no es la misma en todas las cepas estudiadas. Así bien, mientras que las cepas control e IPP1-NES presentan un crecimiento similar a la cepa silvestre W303-1a, la cepa que expresa la quimera IPP1-NLS mostró una notable reducción de la tasa de crecimiento respecto al resto de levaduras, probablemente como resultado de los diferentes niveles de funcionalidad de las sPPasas quiméricas (Figura 3.2.7).

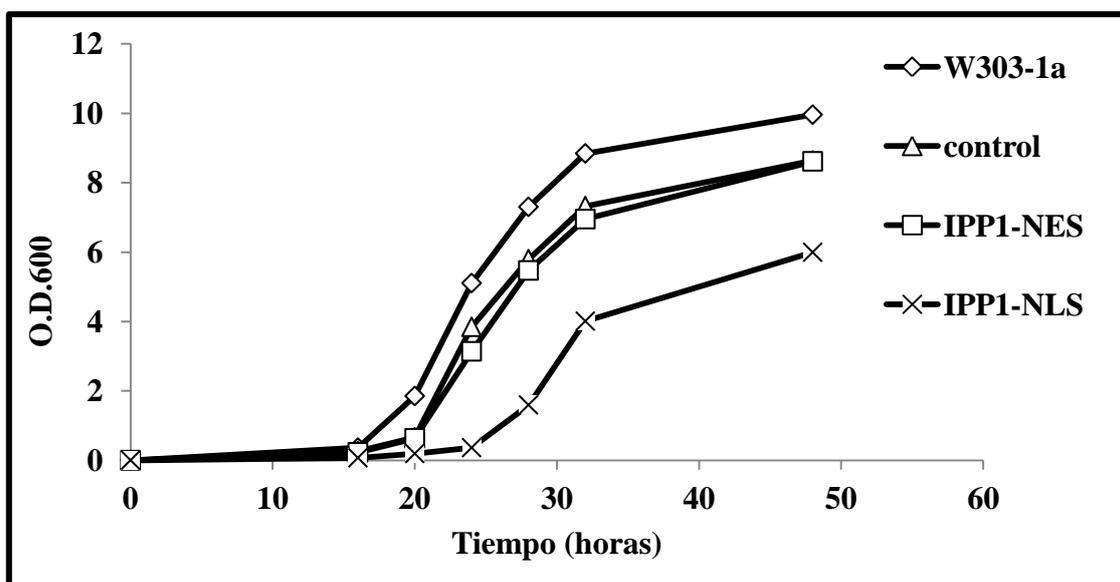


Figura 3.2.7: Curvas de crecimiento en medio líquido con glucosa (YPD) de las estirpes de *S. cerevisiae* W303-1a y su derivada YPC3 transformada con las construcciones génicas que codifican sPPasas Ipp1p quiméricas de diferente localización subcelular.

Los datos obtenidos en el primer apartado de resultados, indican que la ausencia de Ipp1p en levaduras con metabolismo fermentativo, genera muerte celular por autofagia. Estos resultados junto con los obtenidos en este apartado, que muestran niveles de expresión inferiores de la sPPasa quimérica en la cepa IPP1-NLS, dieron lugar a la hipótesis de una mayor susceptibilidad a la autofagia en esta cepa, debido a que el exceso de PPI puede inhibir la síntesis de NAD^+ .

Como primera aproximación se analizó la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas en condiciones de inducción de autofagia. Para ello se realizó un ensayo típico de gota tras la incubación de las células en condiciones de hambre absoluta (agua con 2% de glucosa) y en condiciones estándar (YPD) como control

(Figura 3.2.8). Los resultados muestran una reducción significativa de la tasa de crecimiento únicamente en la cepa en la que Ipp1p se confina en el compartimento nuclear, en condiciones de pre-incubación en condiciones de hambre total. Este dato apoya la hipótesis de una mayor susceptibilidad a la autofagia de la cepa IPP1-NLS.



Figura 3.2.8: Ensayos de gota de las diferentes cepas tras crecimiento en condiciones estándar o en condiciones de hambre absoluta (agua + glucosa 2%). Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre placas con glucosa, correspondientes (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células, respectivamente.

Como segundo abordaje para apoyar la hipótesis mencionada, se decidió analizar el procesamiento proteolítico de Atg8p mediante *Western blot* con un anticuerpo contra GFP, tras inducir la autofagia incubando cada cepa en condiciones de hambre absoluta. Para ello, se co-transformaron las diferentes cepas con la construcción GFP-ATG8, utilizada previamente en el primer apartado de resultados. Sin embargo, la co-expresión de la quimera GFP-ATG8 con las quimeras IPP1(NES/NLS)-GFP, impidió determinar el procesamiento de Atg8p, debido a la interferencia de bandas obtenidas por el procesamiento de GFP en ambas quimeras: GFP-ATG8 e IPP1(NES/NLS)-GFP.

3.2.4 Niveles de expresión de las quimeras de Ipp1p en función de la localización subcelular

Dado que los resultados anteriores mostraron diferencias de los niveles de actividad específica sPPasa y proteína Ipp1p para las cepas IPP1-NES e IPP1-NLS,

respecto a la cepa control. Es fundamental evaluar si esas diferencias son debidas a expresión ó a estabilidad de las quimeras. Se analizaron en fracciones subcelulares de las cepas transformantes YPC3 cultivadas con galactosa y glucosa como fuente de carbono (con y sin Ipp1p nativa, respectivamente): 1) los niveles de transcripción del gen *IPP1* cromosómico nativo y de sus construcciones quiméricas, mediante RT-PCR (Figura 3.2.9), 2) los niveles de proteínas Ipp1p nativa y quiméricas, determinados por *Western blot* (Figura 3.2.10 A), y 3) los valores de actividad específica sPPasa en los extractos celulares totales (Figura 3.2.10 B). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de RNA transcrito entre las cepas IPP1-NES e IPP1-NLS, y la cepa control. Sin embargo, sí se observaron claras diferencias en los niveles de proteína y actividad específica sPPasa respecto a las células con la quimera control. En particular, presentó niveles mayores la cepa expresora de la quimera IPP1-NES, mientras que, en el caso de la expresora de la quimera IPP1-NLS estos eran menores que los encontrados para la cepa control. Estos resultados sugieren que las diferencias en los niveles de Ipp1p, en función de la localización subcelular, se deben a mecanismos post-traduccionales.

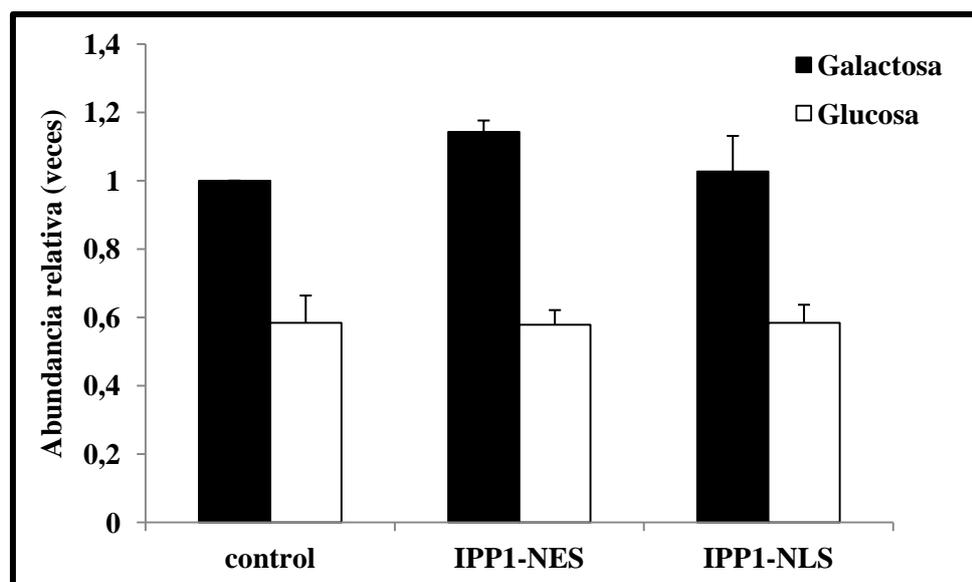
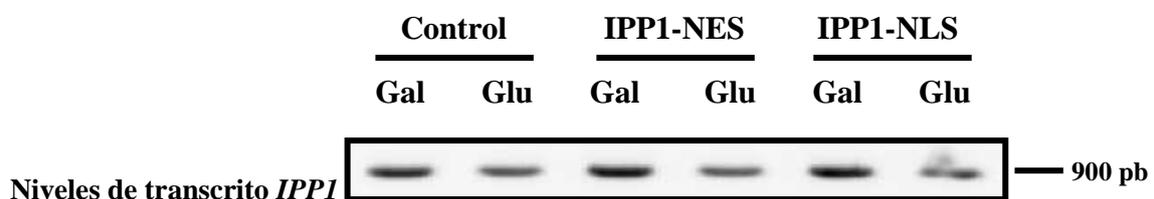


Figura 3.2.9: Niveles de transcrito del gen *IPP1* cromosómico nativo y sus construcciones génicas quiméricas en condiciones de co-expresión (galactosa) y represión (glucosa) del gen cromosómico. La fotografía muestra la banda de ADN de 0,9 kb amplificada por RT-PCR semicuantitativa a partir de 1 μ l del cDNA obtenido a partir de 1 μ g del RNA total usando dos oligos flanqueantes de *IPP1*. El histograma muestra la cuantificación de la abundancia de *IPP1*. Los niveles de expresión conjunta de los transcritos nativos y quiméricos (barras negras) y de los quiméricos exclusivamente (barras blancas).

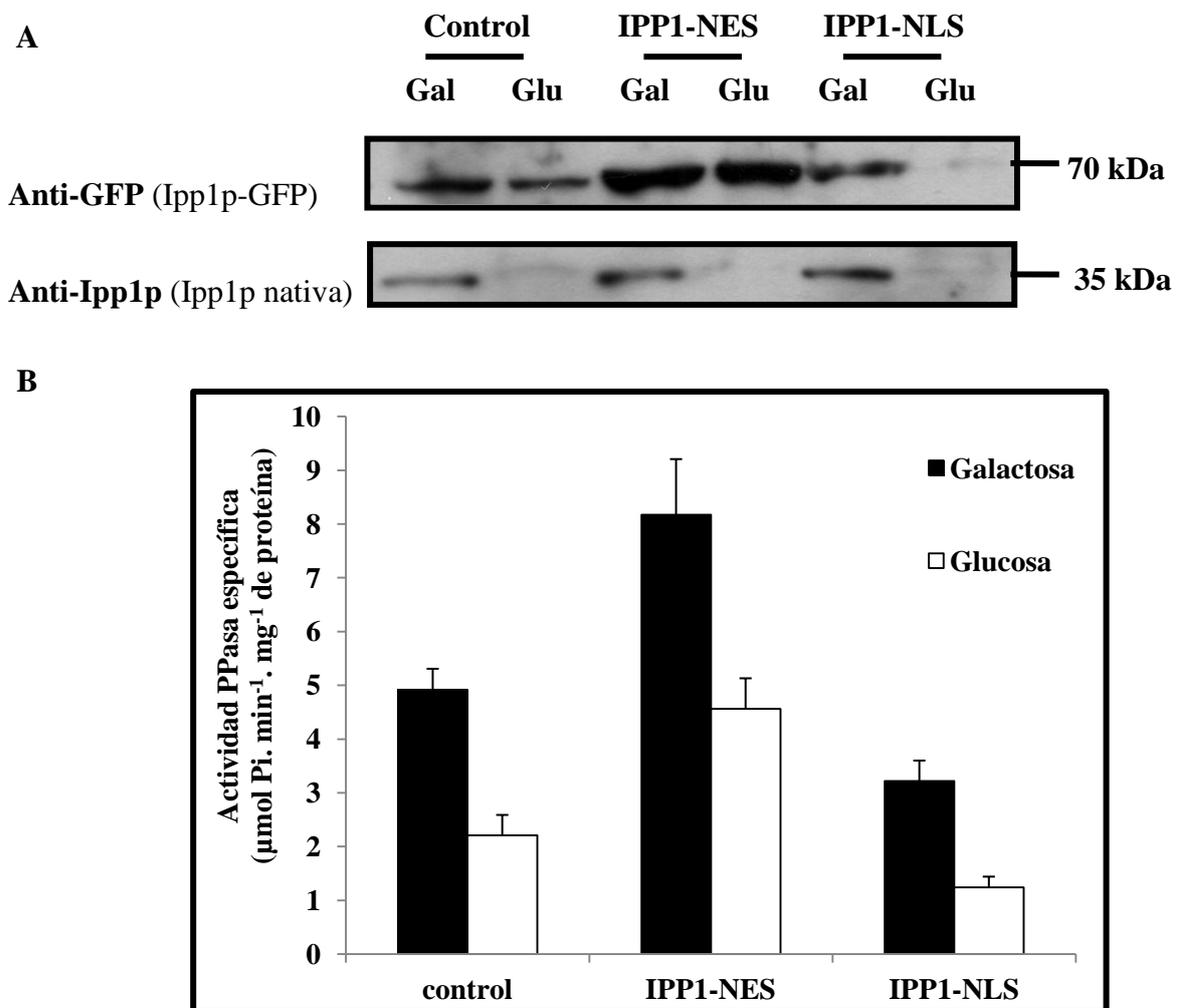


Figura 3.2.10: Niveles de proteínas Ipp1p y de actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de cepas YPC3 transformantes cultivadas en condiciones de co-expresión (galactosa) y represión (glucosa) del gen *IPP1* cromosómico. A) Los niveles de Ipp1p quimérica (70 kDa) y nativa (35 kDa) se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-GFP comercial y anti-sPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*, respectivamente. B) Actividad específica de liberación de fosfato a partir de PPI.

3.2.5 Estabilidad y degradación de Ipp1p en el compartimento nuclear

La caída de los niveles de Ipp1p cuando se confinaba en el compartimento nuclear y, por el contrario, el aumento en el caso de que se localizase preferencialmente

en el citosol, llevó a la hipótesis de que podría existir una regulación de Ipp1p, y que ésta debería ocurrir en el compartimento nuclear.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se comparó la estabilidad de Ipp1p en función de la localización subcelular. Utilizando ensayos de pulso y caza con marcaje radiactivo con metionina-³⁵S, se observó que la quimera IPP1-NLS es menos estable que la quimera control. Mientras que, no se apreció ésta diferencia de estabilidad en el caso de la quimera IPP1-NES (Figura 3.2.12). Además, en el caso de IPP1-NLS, aparece una banda adicional con una masa molecular mayor sugiriendo una modificación post-traducciona de la quimera localizada en el núcleo.

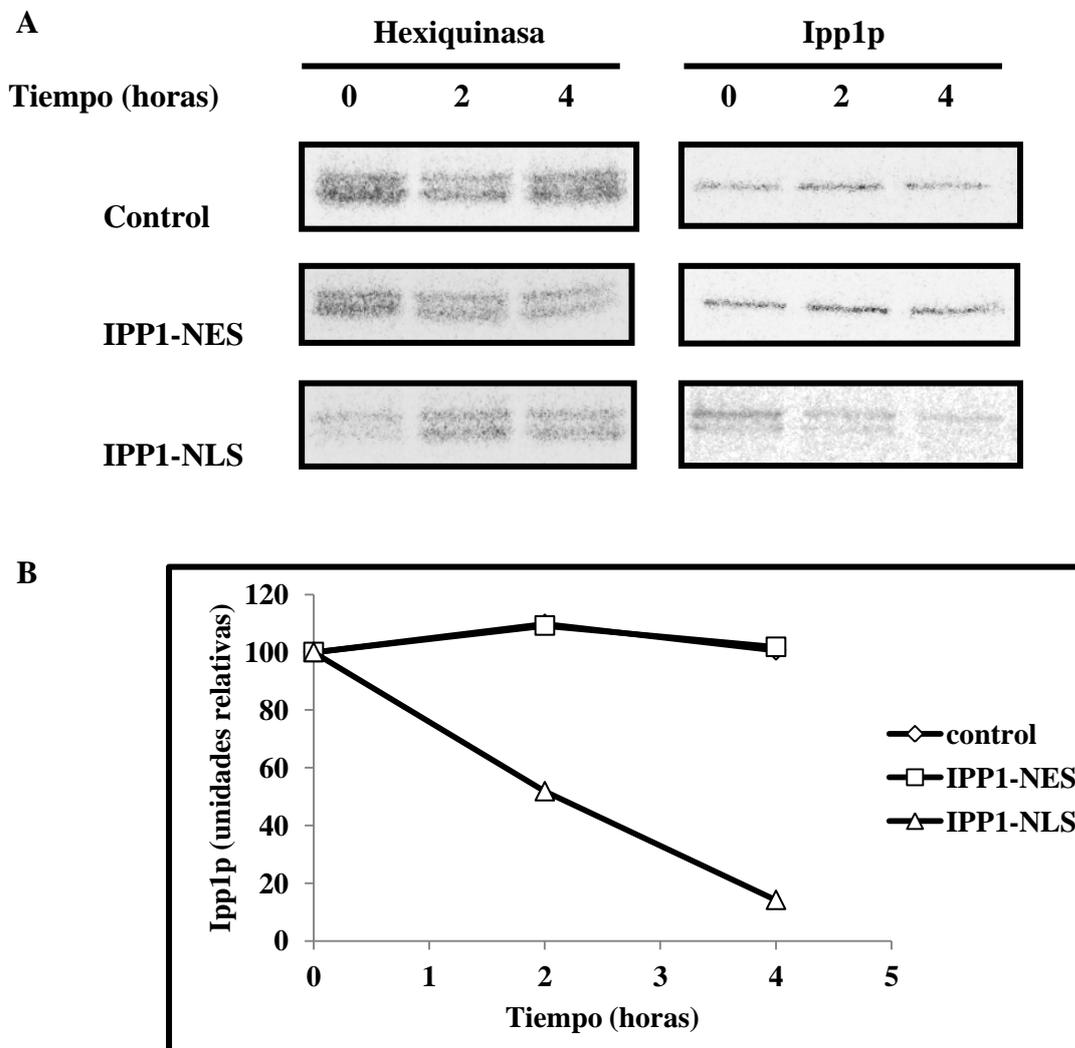


Figura 3.2.11: Experimento de pulso y caza para determinar diferencias en la estabilidad de las proteínas Ipp1p quiméricas con diferente localización subcelular. Para el marcaje radiactivo se utilizó metionina-³⁵S. B) Cuantificación de la señal radioactiva normalizada a 100 para el punto cero de cada cepa.

Para evaluar si la menor estabilidad de la quimera IPP1-NLS es fisiológica, se estudió la susceptibilidad de Ipp1p cromosómica a la degradación por diferentes mecanismos celulares. Para ello se analizaron los niveles, tanto de proteína Ipp1p como de actividad específica sPPasa, en estirpes mutantes de levadura afectadas en el proteasoma nuclear (NA25, mutante termosensible), el proteasoma de RE y citosol (WCGY4-11/22a) y en degradación vacuolar (SAH12, *pep4*Δ). Se observó un claro incremento tanto de los niveles de proteína Ipp1p como de actividad específica sPPasa, únicamente en el mutante deficiente en proteasoma nuclear (Figura 3.2.12), lo que sugiere que la degradación fisiológica de esta enzima es dependiente del proteasoma de este compartimento subcelular.

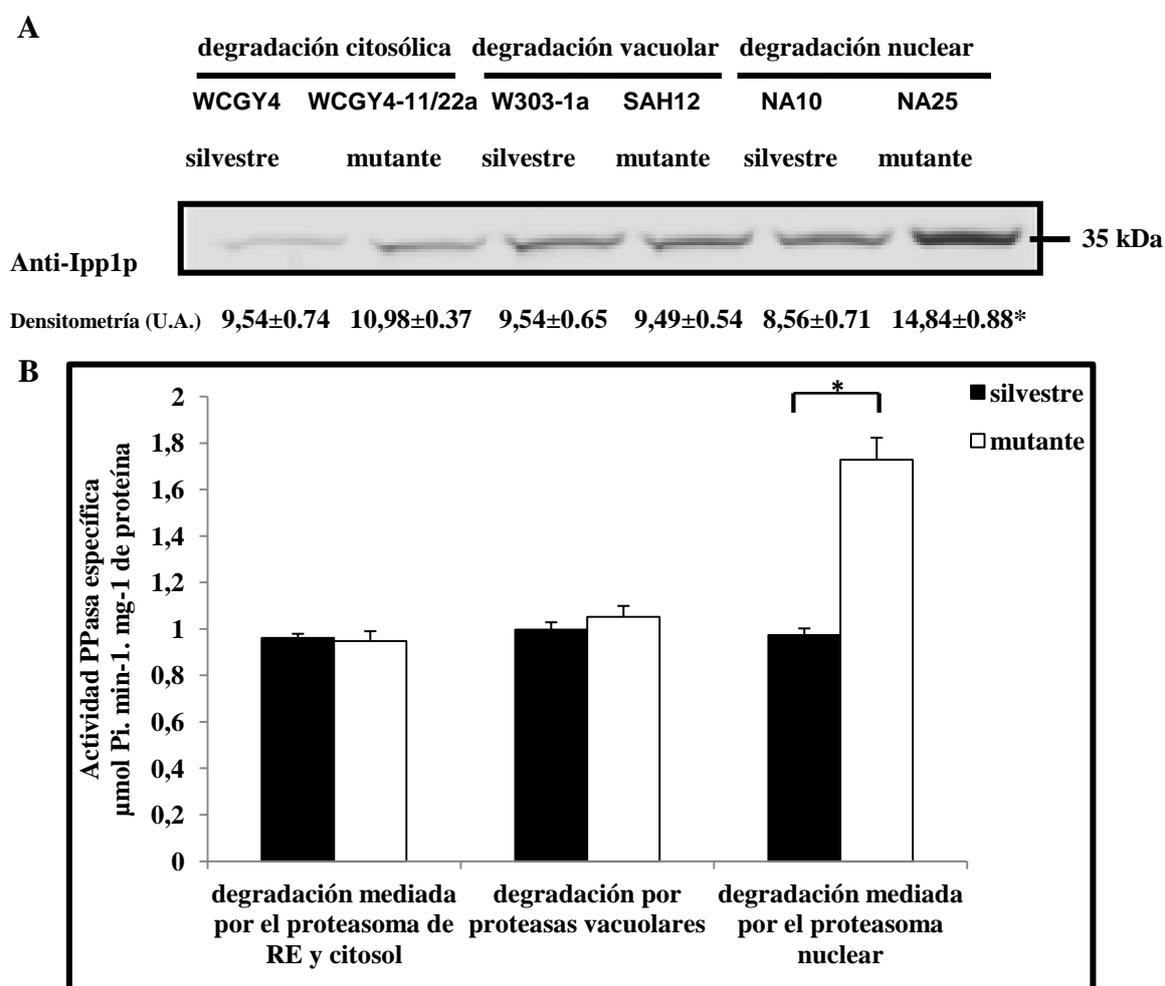


Figura 3.2.12: Niveles de proteína Ipp1p y actividad específica sPPasa de extractos celulares totales de diversas estirpes silvestres y mutantes en diferentes sistemas de degradación selectiva de proteínas celulares. La estirpe NA25 es un mutante termosensible, al igual que el silvestre NA10, fue cultivado a 37 °C para manifestar el fenotipo. A) Los niveles de Ipp1p (35 kDa) se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo contra la sPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. B) Actividad específica de liberación de fosfato a partir de PPi en extractos totales de cada estirpe. Los asteriscos indican una diferencia significativa en el test de Student con un valor de $p < 0,05$.

3.2.6 Regulación nuclear de Ipp1p dependiente de la actividad PPasa

Para determinar si la regulación nuclear de Ipp1p era dependiente de los niveles del polipéptido en sí mismo o de los de su actividad catalítica en dicho compartimento subcelular, se transformó la cepa mutante YPC3 con una construcción génica quimérica (IPP1*-NLS) conteniendo un gen *IPP1* mutado en dos residuos Aspárticos esenciales para la catálisis. Ambos residuos se hallan en el dominio PROSITE PS00387, característico de la sPPasa Familia I (Figura 3.2.13). En este caso, la proteína Ipp1p dirigida al núcleo carece de actividad catalítica sPPasa.

IPP1	CTTTCCACAAACTTGGAAGACCCAAAC-GTA-AGCCACCCAGAACTAA-GGCAGTTG	343
PPA1	CCATCCCTCAGACTTGGAAGACCCAGG--GCACAATGATAAACATACT---GGCTGTTG	341
AtPPA6	C--TTCCTCAAACATGGGAAGATCCATCTCATGCAA--ATTCTGAAGTTGAAGGATGTTT	512
	* *	
	G G	
IPP1	--GTGACAAACGATCCAATTGATGTGTTGGAAATTGGTGAAAC-TATTGCTTACACTGGTC	400
PPA1	TGGTGACAATGACCCAATTGATGTGTGTGAAATTGG---AAG-CAAGGTATGTGCAAG--	395
AtPPA6	TGGGGATAATGATCCAGTTGATGTTGTTGAGATTGGTGAAACACAAAGGA-AGATAGGCG	571
	* *	
IPP1	AAGTCAAGCAA-----GTTAAGGCTCTAGGTATCATGGCTTTATTGGATGAAGGTGAGAC	455
PPA1	AGGTGAAATAATTGGCGTGAAAGTCTAGGCATATTGGCTATGATTGACGAAGGGGAAAC	455
AtPPA6	ATATTCTAAAG-----ATAAAGCCTTTAGCTGCTTTAGCTATGATTGATGAAGGTGAGCT	626
	* *	

Figura 3.2.13: Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos de distintas sPPasas. Mutaciones realizadas para generar la construcción IPP1*-NLS. Se alinearon las secuencias de tres sPPasas Familia I: *IPP1*, *PPA1* (sPPasa humana) y *AtPPA6* (sPPasa cloroplástica de *A. thaliana*). Dos Aspárticos del dominio PROSITE PS00387 fueron sustituidos por dos Glicinas mediante dos mutaciones puntuales de dos adeninas (rojo) por dos guaninas (azul).

Se analizaron tanto los niveles de proteína como de actividad específica de esta cepa, y se comparó con la cepa control y con la cepa IPP1-NLS, expresora de la Ipp1p activa dirigida al núcleo (Figura 3.2.14). Se observó la pérdida esperada de actividad sPPasa de la quimera IPP1*-NLS catalíticamente inactiva. Respecto a los niveles de proteína, se vieron aumentados, respecto a las cepas control e IPP1-NLS, demostrando que la regulación nuclear de Ipp1p es dependiente de la actividad PPasa y no de los niveles polipéptido.

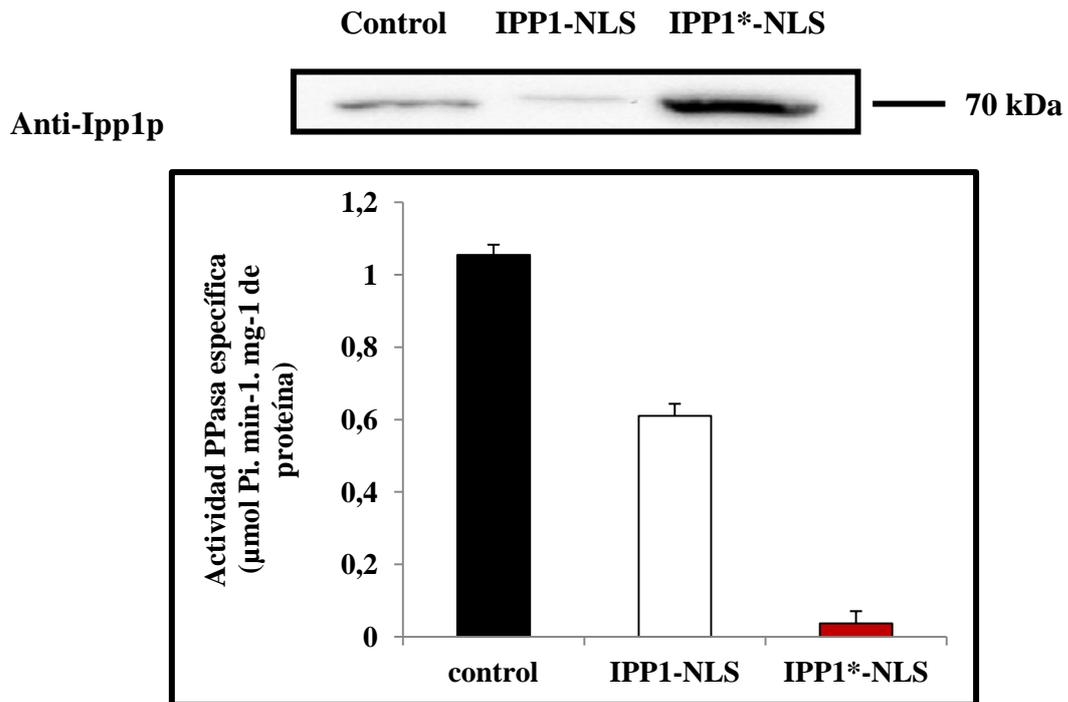


Figura 3.2.14: Niveles de proteína Ipp1p y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de cepas transformantes YPC3, expresasoras de proteínas quiméricas nucleares Ipp1p activas o carentes de actividad catalítica. A) Los niveles de Ipp1p se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo comercial contra la proteína GFP. En cada pocillo se cargaron 50 μg de extractos celulares totales. B) Actividad específica de liberación de fosfato a partir de PPi en extractos celulares totales.

3.3 Expresión y localización subcelular de sPPasas de diferentes orígenes en levadura y células de mamífero.

Las PPasas inorgánicas pueden dividirse en dos grupos en función de su estructura y actividad catalítica: sPPasas y PPasas de membrana. Hay organismos, como hongos y metazoos, que sólo poseen sPPasas y otros, como los vegetales, en cuyos genomas hay genes predichos para ambos tipos de PPasas. Sin embargo, El escenario metabólico del PPI en células vegetales está aún por esclarecer, se desconoce la localización subcelular de la mayoría de sPPasas y si éstas coexisten espacialmente con las H⁺-PPasas.

Las sPPasas a su vez pueden subdividirse en dos familias, I y II, aunque no presentan similitud ni en secuencia ni en estructura, la conformación espacial del sitio activo, así como el mecanismo catalítico son análogos para ambas familias (Gomez Garcia, Poort et al. 2001). Para comprobar si son intercambiables, se han expresado en dos sistemas modelo, *S. cerevisiae* y mamíferos, una serie de sPPasas de diversas procedencias (microorganismos y plantas) que presentan diferentes localizaciones subcelulares nativas (citosol, plástidos, mitocondrias), y que pertenecen a la Familia I. Además, se incluyó la sPPasa de la bacteria *Streptococcus mutans* como representante de la Familia II (Tablas VI y VII).

3.3.1 Expresión heteróloga de sPPasas en levadura

Se transformó el mutante YPC3 con una serie de construcciones génicas, contenidas en el vector lanzadera de expresión pUG35. Estas construcciones codifican fusiones traduccionales de las diferentes sPPasas con la proteína verde fluorescente yEGFP en el extremo C-terminal, lo que permite verificar su localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia (Figura 3.3.1). En el caso de sPPasas de orgánulos celulares, plástidos y mitocondrias, se generaron construcciones que codifican las correspondientes proteínas maduras (marcadas con asteriscos), eliminando los péptidos de tránsito N-terminales naturales que se procesan al alcanzar el compartimento de destino.

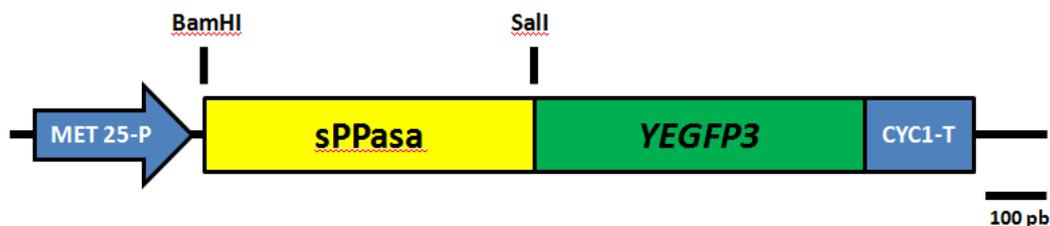


Figura 3.3.1: Representación esquemática de las construcciones génicas utilizadas para la expresión heteróloga de sPPasas en levadura. Leyenda; Met25-P: promotor del gen Met25, CYC-1: terminador del gen CYC1, sPPasa: ORF del gen codificante para cada sPPasa, YEGFP: ORF del gen YEGFP, aparecen señalados los dos sitios de corte de restricción utilizados para generar la construcción (BamHI y Sall).

Tabla VI: Genes de las sPPasas utilizados para la expresión heteróloga en levadura

GEN (Código genómico y/o número de acceso NCBI)	Tipo de sPPasa, organismo y reino
<i>ScIPP1</i> (YBR011C)	sPPasa Familia I de <i>S. cerevisiae</i> (Fungi)
<i>ScIPP2*</i> (YMR267W*)	sPPasa mitocondrial madura (sin péptido de tránsito) de <i>S. cerevisiae</i> (Fungi)
<i>ScIPP2</i> (YMR267W)	sPPasa Familia I mitocondrial (precursor) de <i>S. cerevisiae</i> (Fungi)
<i>HsPPA1</i> (HGNC:9226; NM_021129.3)	sPPasa Familia I humana, isoforma mayoritaria (Animalia)
<i>AtPPA1</i> (At1g01050)	sPPasa Familia I tipo bacteriano de la planta <i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)
<i>AtPPA6*</i> (At5g09650*)	sPPasa cloroplástica madura (sin péptido de tránsito) de <i>A. thaliana</i> (Plantae)
<i>AtPPA6</i> (At5g09650)	sPPasa Familia I cloroplástica (precursor) de <i>A. thaliana</i> (Plantae)
<i>SyPPA</i> (AJ252207.1)	sPPasa Familia I de la <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (Monera/Cianobacteriae)
<i>SmPPA</i> (AAC05778)	sPPasa Familia II (DHH-DHHA2 fosfoesterasa) de <i>Streptococcus mutans</i> (Monera/Bacteria)

En primer lugar se comprobó la efectividad de las construcciones, así como la expresión y localización subcelular de cada sPPasa en levadura mediante microscopía de fluorescencia (Figura 3.3.2).

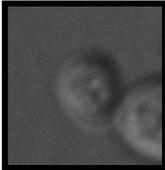
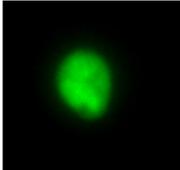
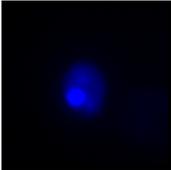
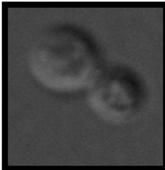
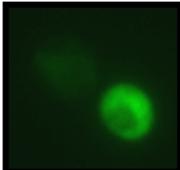
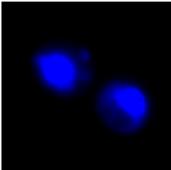
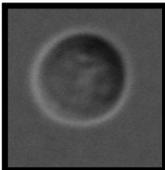
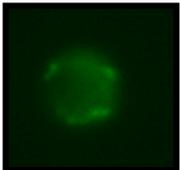
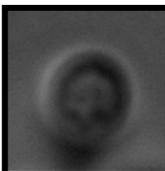
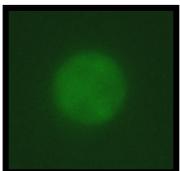
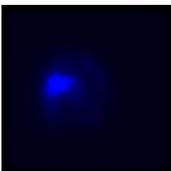
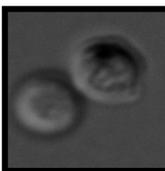
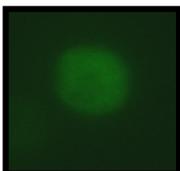
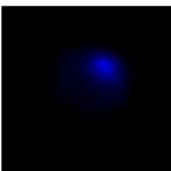
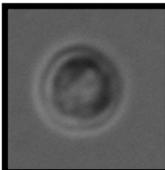
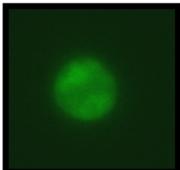
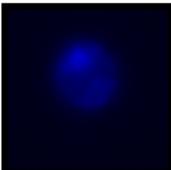
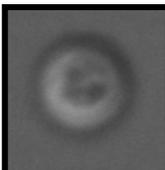
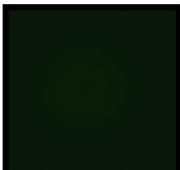
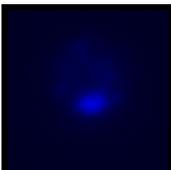
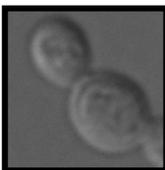
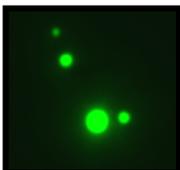
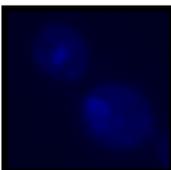
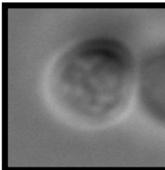
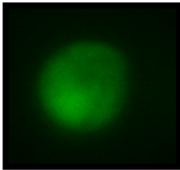
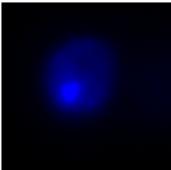
	Campo claro	yEGFP (495-512 nm)	Hoechst ()	Localización celular
ScIPP1				tentativa núcleo-citosólica
ScIPP2*				citósólica
ScIPP2				mitocondrial
HsPPA1				citósólica
AtPPA1				citósólica
AtPPA6*				núcleo-citosólica
AtPPA6				indetectable
SyPPA				cuerpos proteicos
SmPPA				núcleo-citosólica

Figura 3.3.2: Localización subcelular determinada mediante microscopia de fluorescencia de las diferentes sPPasas recombinantes expresadas en la cepa YPC3 de *S. cerevisiae*. Los núcleos se marcaron con el colorante fluorescente de DNA, Hoechst 33342 (2 µg/ml, Sigma-Aldrich). Imágenes adquiridas por el microscopio de fluorescencia Leica DM 6000B.

Se analizaron nueve sPPasas diferentes. Se eligieron ScIPP1 y ScIPP2 como base por ser estas las proteínas endógenas de *S. cerevisiae*. La pirofosfasa ScIPP1 presentó una buena expresión, siendo claramente visible al microscopio de fluorescencia, y una localización núcleo-citosólica, idéntica a la obtenida en estudios anteriores (Figura 3.2.1) utilizando un vector de expresión diferente ó analizando la proteína codificada por la ORF cromosómica.

La sPPasa mitocondrial de levadura (ScIPP2) presentó también un nivel adecuado de expresión y una localización pericelular acorde con su localización mitocondrial nativa. Al expresar una versión modificada de esta proteína sin péptido de tránsito, su localización se vio alterada, pasando a detectarse de forma difusa en el citosol.

Tanto HsPPA1 como AtPPA1, presentaron niveles de expresión inferiores a los de las sPPasas nativas de levadura (ScIPP1 y ScIPP2). Ambas mostraron una distribución citosólica.

Mientras que la sPPasa cloroplástica de *A. thaliana*, AtPPA6 no mostró ninguna fluorescencia, la versión modificada sin péptido de tránsito, AtPPA6*, presentó un débil nivel de expresión similar al de las sPPasas HsPPA1 y AtPPA1, y una localización núcleo-citosólica.

La sPPasa de *Synechocystis* sp. PCC6803 mostró un elevado nivel de expresión en el sistema heterólogo. Respecto a la localización subcelular, se observó una fluorescencia en acúmulos (dos por células) de localización incierta, pudiéndose tratar de acúmulos tipo “*protein bodies*” (Teixeira and Parker 2007).

Sorprendentemente, SmPPA, la sPPasa más alejada tanto en secuencia como en estructura a la sPPasa nativa de levadura, presentó un alto nivel de expresión en el sistema heterólogo. En cuanto a la localización subcelular, mostró una distribución núcleo-citosólica, con acumulación de fluorescencia en el compartimento nuclear.

Dada la alta analogía en la conformación espacial del sitio activo y del mecanismo catalítico que presentan las sPPasas, se analizó la capacidad de las sPPasas recombinantes para complementar funcionalmente la deficiencia de Ipp1p en cepas transformantes YPC3, cultivadas en medio YPD, mediante un ensayo típico de gota (Figura 3.3.3). Los resultados mostraron una correlación entre los niveles de expresión, determinados por intensidad de fluorescencia de la quimera sPPasa-yEGFP, y la eficiencia de la complementación funcional de la carencia de Ipp1p (fenotipo de crecimiento positivo). De este modo, las cepas que expresaban las sPPasas quiméricas ScIPP1, ScIPP2* y SmPPA fueron las que mejor complementaron. Por el contrario, la cepa que expresaba AtPPA6 y que no mostró fluorescencia, no complementó al mutante YPC3. La única excepción fueron las células que expresaban ScIPP2, pues aunque si presentaron altos niveles de expresión, no se observó complementación funcional de la carencia de Ipp1p. El resto de sPPasas quiméricas, HsPPA1, AtPPA1, AtPPA6* y SyPPA complementaron el mutante YPC3 pero con menor eficiencia.

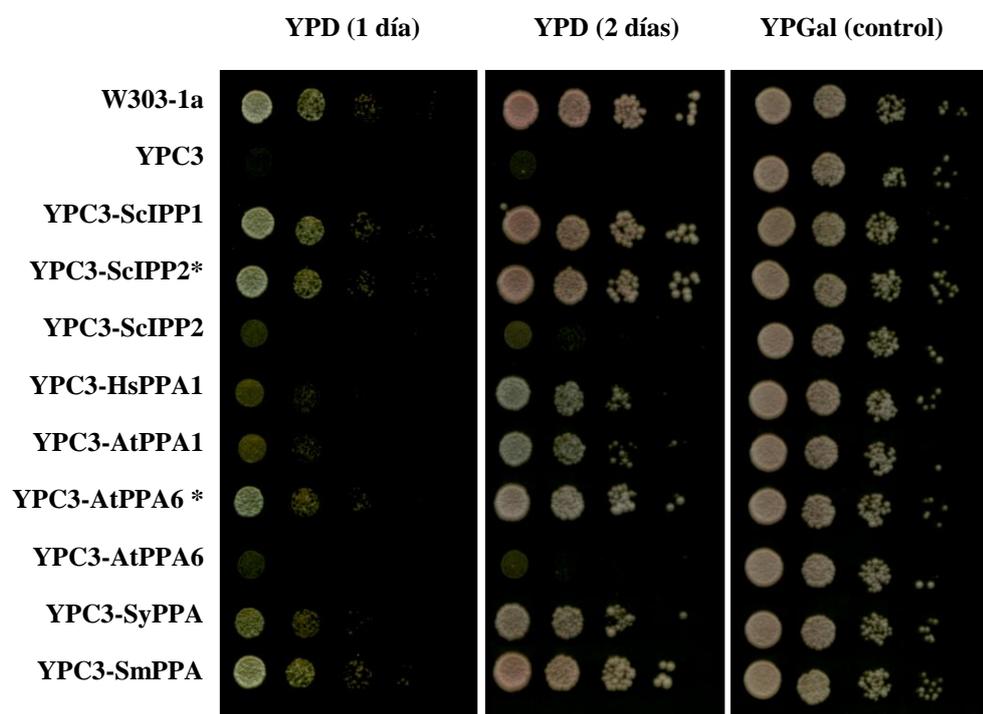


Figura 3.3.3: Complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p endógena por las diferentes sPPasas heterologas quiméricas de origen vegetal y microbiano. Crecimiento comparativo en glucosa (1 y 2 días) y galactosa (2 días) de las distintas cepas. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre placas con glucosa ó galactosa, correspondientes (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células, respectivamente.

Se analizó también el comportamiento de las diferentes cepas en condiciones de crecimiento en medio líquido midiendo la O.D.₆₀₀ a lo largo del tiempo (Figura 3.3.4). Atendiendo a las tasas de crecimiento, se pudieron diferenciar tres grupos: 1) cepas transformantes con tasas de crecimiento similar a la cepa silvestre W303-1a: ScIPP1, ScIPP2* y SmPPA, 2) cepas con un crecimiento moderado: HsPPA1, AtPPA1, AtPPA6* y SyPPA, y finalmente, 3) cepas que aún expresando las sPPasas IPP2 y ATPPA6 no mostraron crecimiento alguno, al igual que la cepa YPC3 sin transformar. Sorprendentemente, la cepa que expresa la sPPasa quimérica ScIPP2, fué capaz con el tiempo, de retomar el crecimiento.

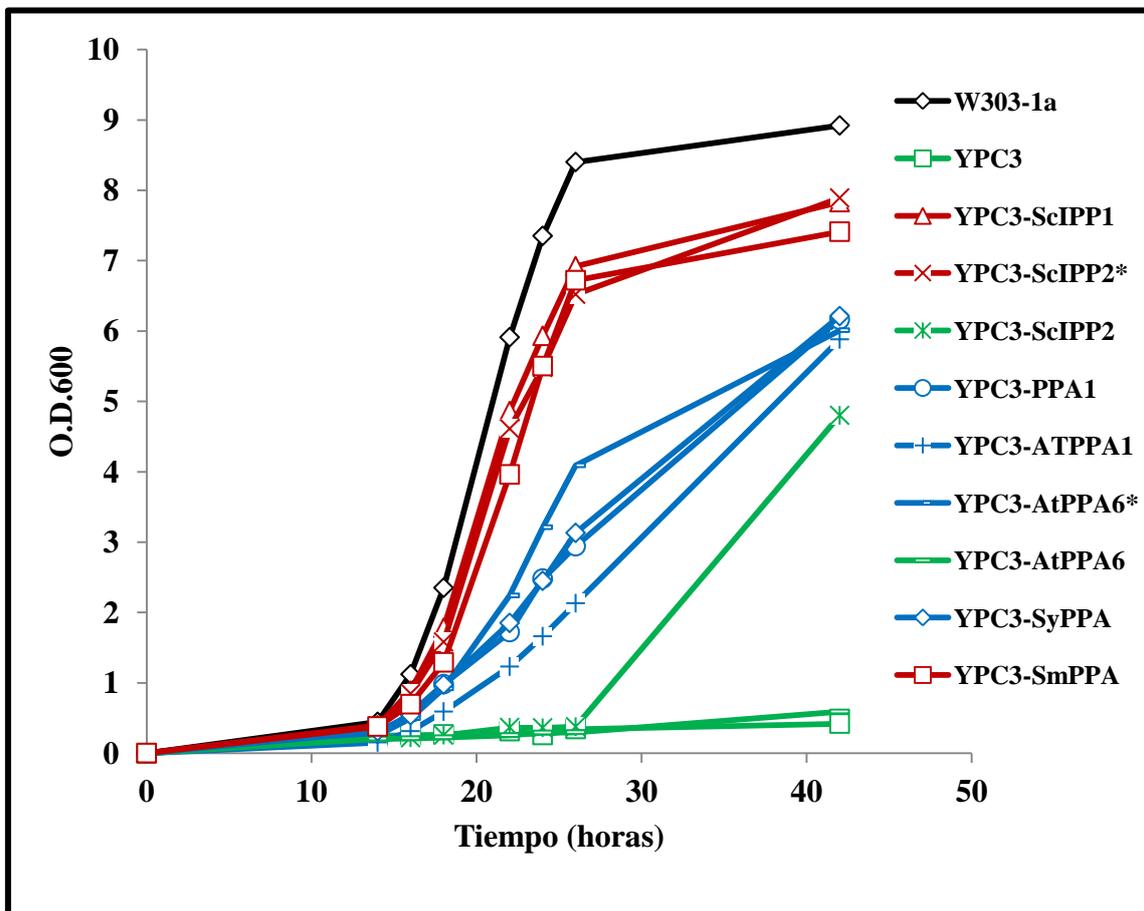


Figura 3.3.4: Curvas de crecimiento en medio líquido con glucosa (YPD) de las estirpes de *S. cerevisiae* W303-1a y una serie de transformantes de su derivada YPC3 expresoras de sPPasas recombinantes de origen vegetal y microbiano y de diversa localización subcelular. Crecimiento medido como dispersión de luz del cultivo a 600 nm.

A continuación, se determinaron para cada cepa, los niveles de proteína mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-sPPasa, y la actividad específica sPPasa en extractos celulares totales (Figura 3.3.5). Para la cepa que expresaba la sPPasa de *Streptococcus mutans* Familia II se realizó una segunda serie de medidas de actividad PPasa específica pre-incubando durante media hora con $MnCl_2$, debido a que las sPPasas pertenecientes a esta familia muestran una mayor eficiencia catalítica utilizando Mn^{2+} como cofactor en lugar de Mg^{2+} (Figura 3.3.6).

Se obtuvieron diferentes niveles de proteína y actividad PPasa específica de las sPPasa quiméricas. Se utilizaron los valores de ScIPP1 como control, al ser la sPPasa nativa mayoritaria en levadura. Tanto ScIPP2 como su forma madura, ScIPP2*, mostraron niveles tanto de proteína como de actividad PPasa específica similares y ligeramente inferiores a los obtenidos para ScIPP1.

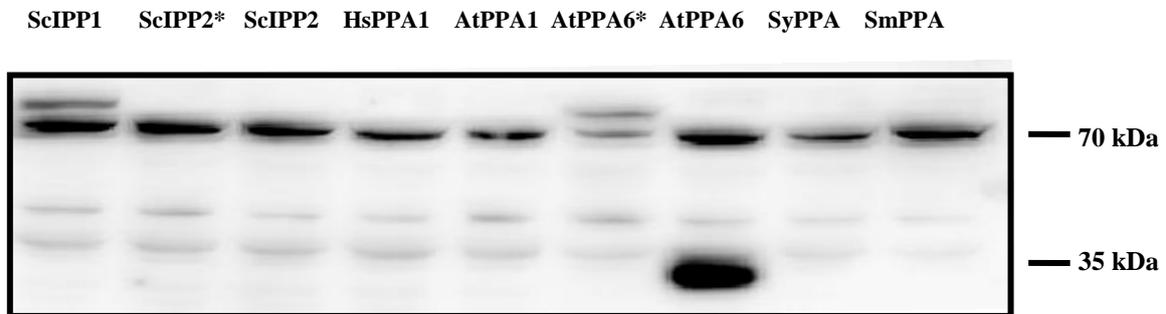
En el caso de las sPPasas heterólogas, HsPPA1, AtPPA1, AtPPA6* y SyPPA, estos niveles decrecieron, obteniéndose unos valores de actividad PPasa específica de aproximadamente un tercio del valor obtenido para la sPPasa control. Además, mediante *Western blot*, se observó una banda adicional ligeramente superior para AtPPA6*. Esta banda superior, similar a la obtenida para ScIPP1, es característica de la forma nuclear de ScIPP1 (aparatado 3.2), sugiriendo una localización núcleo-citosólica de AtPPA6*.

La sPPasa SmPPA, presentó niveles de proteína y de actividad sPPasa específica similares a ScIPP1, incluso en el caso de la preincubación con Mn^{2+} (cofactor más eficiente para sPPasas Familia II), el valor de actividad PPasa fue aproximadamente el doble del valor obtenido para la sPPasa control preincubada con Mg^{2+} (cofactor más eficiente para sPPasas Familia I).

Los resultados previos para la cepa que expresa AtPPA6, mostraron una incapacidad tanto de crecimiento como de complementación de la deficiencia de *Ipp1p*, así como ausencia de fluorescencia bajo el microscopio. Sin embargo, esta cepa presentó altos niveles de actividad PPasa y de proteína en extractos celulares. En el *Western blot* se observó una banda de proteína adicional de aproximadamente 30 kDa, una masa molecular cercana a la esperada para la sPPasa madura. Esto sugiere un procesamiento proteolítico de la quimera AtPPA6-yEGFP que genera una sPPasa

funcional, pero que de algún modo, es incapaz de acceder al “pool” de PPi nucleocitoplásmico y complementar funcionalmente la deficiencia de Ipp1p.

A



B

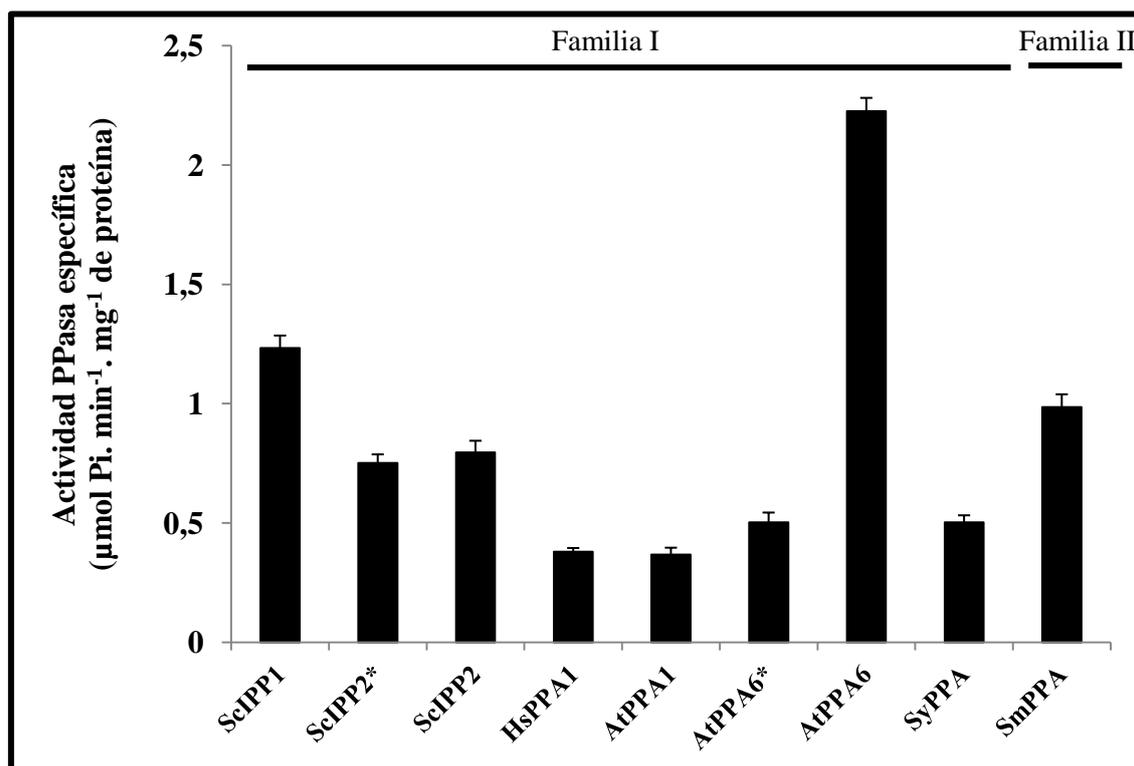


Figura 3.3.5: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas con glucosa. A) Los niveles de las diferentes sPPasas se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo contra la sPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. En cada pocillo se cargaron 50 μg de extractos celulares. B) Actividad específica ensayada en condiciones estándar de liberación de fosfato a partir de PPi en extractos totales de las diferentes cepas.

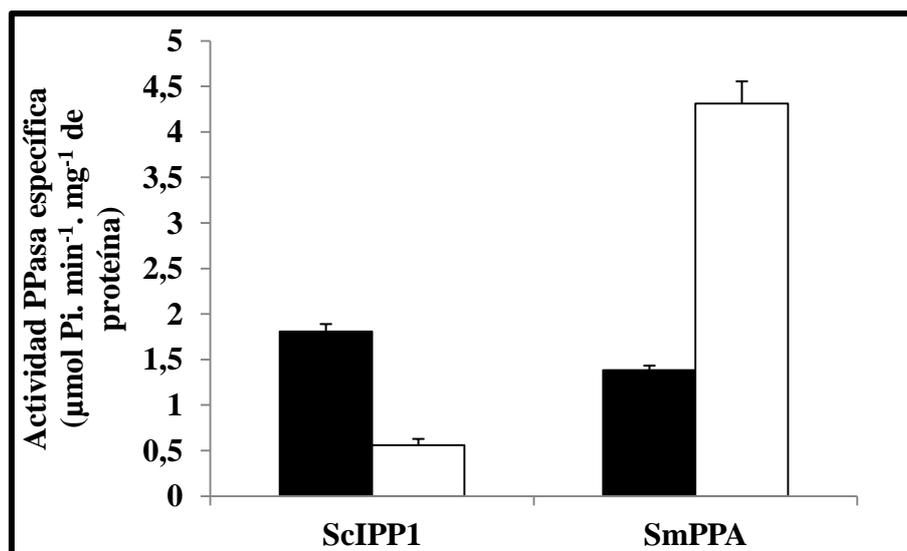


Figura 3.3.6: Actividad sPPasa específica de ScIPP1 y SmPPA. Extractos totales de células YPC3 expresantes de ScIPP1 (sPPasa Familia I) ó SmPPA (sPPasa Familia II) fueron preincubados en presencia de 2 mM de Mg²⁺ (barras negras) ó 2 mM de Mn²⁺ (barras blancas). Actividad en μmol de fosfato liberado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Una posibilidad que explica los resultados obtenidos para la quimera AtPPA6-yEGFP, es que la levadura la dirige a la vacuola, donde es procesada por proteasas vacuolares hasta una forma sPPasa madura funcional. De esta manera, al estar compartimentalizada en la vacuola, sería incapaz de acceder al “pool” de PPI nucleocitoplásmico y, por tanto, no podría complementar funcionalmente la deficiencia de Ipp1p. Para comprobar esta hipótesis, se transformó con la construcción AtPPA6-yEGFP a la estirpe mutante en el procesamiento proteolítico en vacuola, BJ5459, y se determinaron los niveles de proteínas yEGFP y sPPasa así como la actividad PPasa específica (Figura 3.3.7). En el *Western blot* revelado con el anticuerpo anti-sPPasa se observó pérdida de la banda de 35 kDa en extractos totales de la cepa BJ5459-AtPPA6, y observada en extractos totales de la cepa YPC3-AtPPA6. Esta pérdida indicaría la existencia de un procesamiento proteolítico en la vacuola de la quimera AtPPA6-yEGFP apoyando la hipótesis inicial. Sin embargo, no se observó la aparición de la banda de 70 kDa, correspondiente a la quimera sin procesar, en los mismos extractos, lo que podría indicar un procesamiento alternativo de la quimera AtPPA6-yEGFP en el mutante BJ5459. Por otra parte, no se observó señal yEGFP de extractos de cepas YPC3 y BJ3439 transformadas con AtPPA6 indicando que el procesamiento proteolítico sufrido por la quimera genera la pérdida de reconocimiento por el anticuerpo anti-yEGFP.

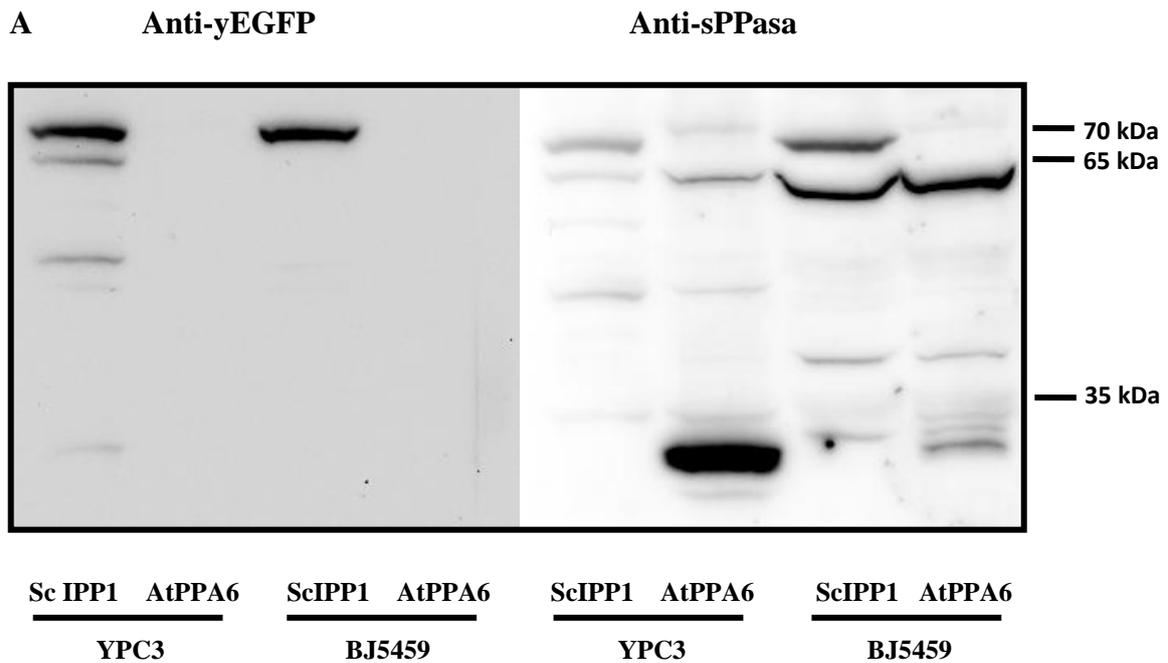
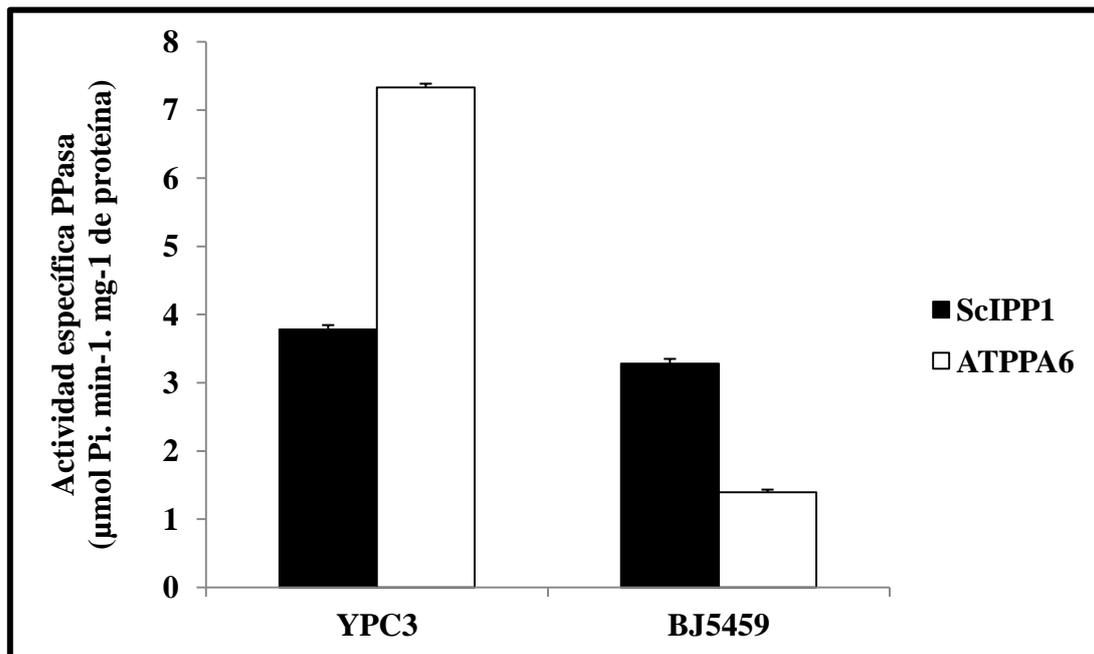
**B**

Figura 3.3.7: Niveles de sPPasas quiméricas y actividad PPasa específica en extractos celulares totales de cepas YPC3 y BJ5459 transformadas con las quimeras ScIPP1-yEGFP y AtPPA6-yEGFP. A) Los niveles de proteínas quiméricas para cada cepa se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-GFP comercial y anti-sPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. En cada pocillo se cargaron 50 μg de extractos celulares. B) Actividad específica de liberación de fosfato a partir de PPi.

3.3.2 Expresión heteróloga de sPPasas en células de mamífero

Para la expresión heteróloga de sPPasas en mamíferos, se utilizó la línea celular de fibroblastos HEK-293T. Estas células se transfectaron con diferentes construcciones génicas análogas a las utilizadas para levaduras (Figura 3.3.8). En este caso, se utilizó el vector de expresión de mamíferos, pWPXL. Este vector es de expresión transitoria, y permite la expresión de transgenes clonados tras el promotor EF1 α .

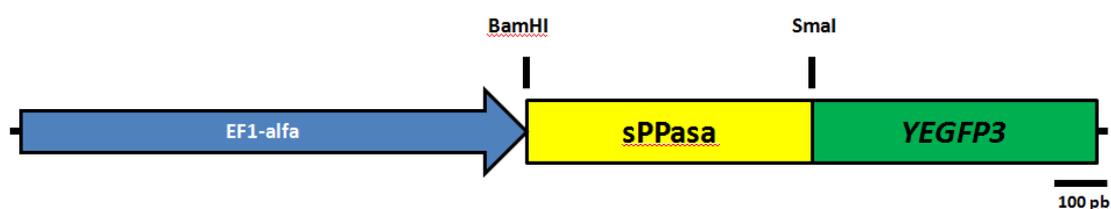


Figura 3.3.8: Representación esquemática de las construcciones génicas utilizadas para la expresión heteróloga de sPPasas en células de mamífero. Leyenda; EF1-alfa: promotor del gen EF1 α , sPPasa: ORF del gen codificante para cada sPPasa, YEGFP: ORF del gen YEGFP, aparecen señalados los dos sitios de corte de restricción utilizados para generar la construcción (BamHI y SmaI).

Tabla VII: Genes de las sPPasas utilizados para la expresión heteróloga en células de mamífero

GEN (Código genómico y/o número de acceso NCBI)	Tipo de sPPasa, organismo y reino
<i>HsPPA1</i> (HGNC:9226; NM_021129.3)	sPPasa Familia I humana, isoforma mayoritaria (Animalia)
<i>ScIPP1</i> (YBR011C)	sPPasa Familia I de <i>S. cerevisiae</i> (Fungi)
<i>AtPPA1</i> (At1g01050)	sPPasa Familia I tipo bacteriano de la planta <i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)
<i>AtPPA6*</i> (At5g09650*)	sPPasa cloroplástica madura (sin péptido de tránsito) de <i>A. thaliana</i> (Plantae)
<i>SmPPA</i> (AAC05778)	sPPasa Familia II (DHH-DHHA2 fosfoesterasa) de <i>Streptococcus mutans</i> (Monera/Bacteria)

Al igual que en levaduras, se comprobó la efectividad de las construcciones, así como la expresión y localización subcelular de cada sPPasa, en la línea celular de fibroblastos HEK-293T mediante microscopía de fluorescencia (Figura 3.3.9). Se analizaron cinco PPasas quiméricas diferentes. La pirofosfasa endógena de humanos,

HsPPA1, fue la que presentó una mejor expresión, siendo claramente visible al microscopio de fluorescencia e indicando una localización núcleo-citosólica. La sPPasa Familia II, SmPPA, mostró también una excelente expresión, y aunque se observó fluorescencia en núcleo y citosol, ésta fue más intensa en el compartimento citosólico. El resto de sPPasas quiméricas, (ScIPP1, AtPPA1 y AtPPA6*) presentaron un menor nivel de expresión en el sistema heterólogo y una localización subcelular preferentemente citosólica.

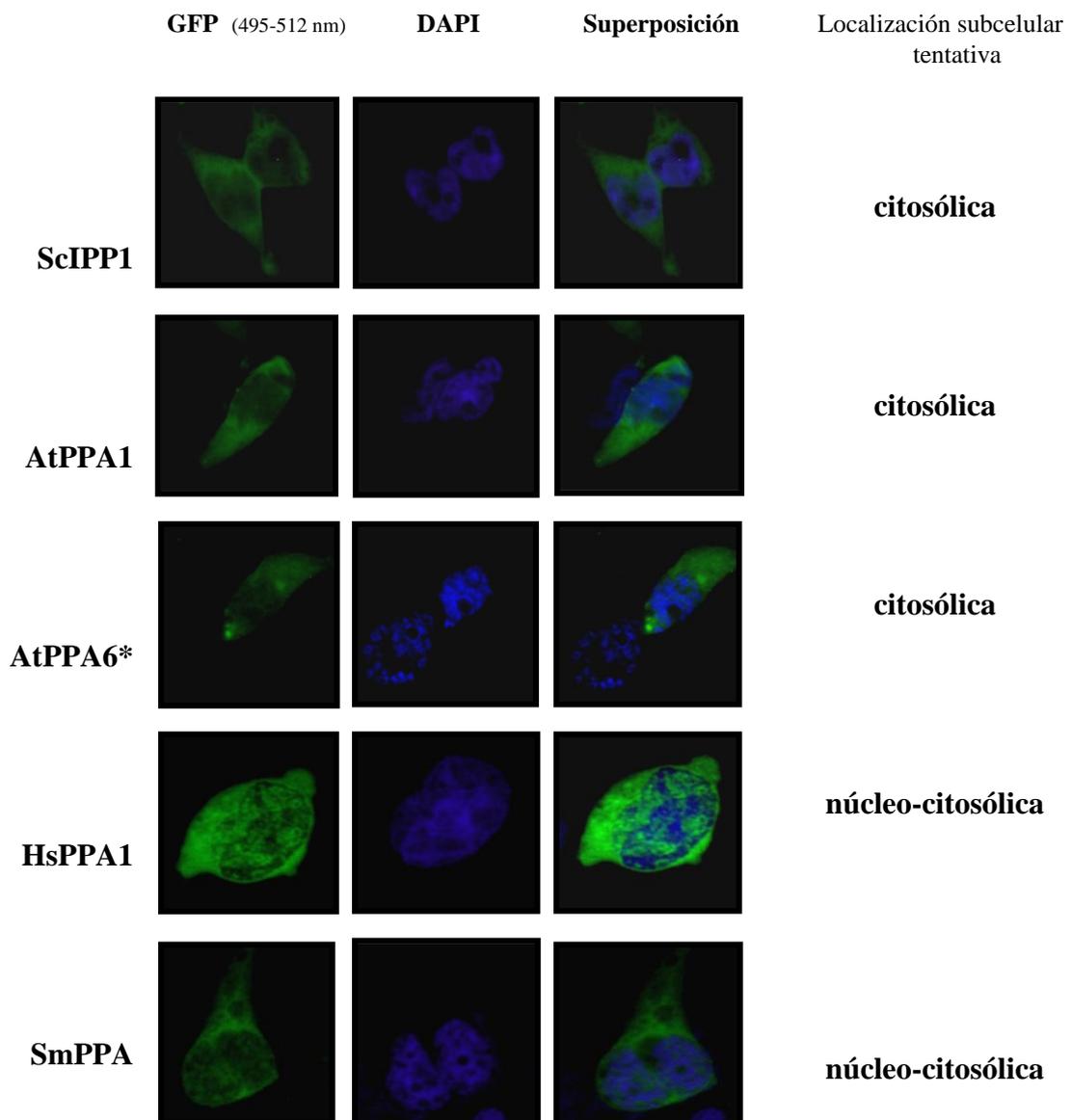


Figura 3.3.9: Localización subcelular determinada mediante microscopia de fluorescencia de las diferentes sPPasas recombinantes expresadas en la línea celular de fibroblastos HEK-293T. Los núcleos se marcaron con el colorante fluorescente de DNA, DAPI (Sigma-Aldrich). Imágenes adquiridas por el microscopio de fluorescencia Olympus BX40.

Al igual que se determinó la localización núcleo-citosólica de Ipp1p en la levadura (Apartado 3.2), esta es la primera vez que se ha demostrado la localización núcleo-citosólica para HsPPA1, la isoforma mayoritaria de sPPasa en células humanas.

3.4 Reproducción del escenario metabólico del PPI de células vegetales utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota

El escenario metabólico del PPI en células vegetales está aún por esclarecer totalmente. La principal diferencia entre hongos y metazoos de una parte y los eucariotas fotosintéticos (microalgas y plantas), es que en éstos coexisten sPPasas y H⁺-PPasas asociadas a membranas. Uno de los organismos fotosintéticos más estudiado ha sido la planta modelo *A. thaliana*, en la que se han identificado tres genes que codifican H⁺-PPasas: AVP1, que codifica una H⁺-PPasa dependiente de K⁺ localizada en la membrana vacuolar que se expresa en diferentes estadios de crecimiento y tejidos, y es esencial para la viabilidad de la planta; AVP2, que codifica una H⁺-PPasa independiente de K⁺ localizada en membranas del aparato de Golgi, no es una proteína esencial para la viabilidad de la planta y se expresa principalmente en tejidos con altas tasas de crecimiento así como en plantas etioladas; y AVP3, muy similar a AVP2, de localización y función desconocidas, y con mínimos niveles de expresión (Herrera-Palau, Tesis doctoral, 2011). Respecto a las sPPasas, las células de *A. thaliana* presentan 6 genes diferentes (ATPPA 1-6) que codifican enzimas de la Familia I. Aunque se conoce su presencia en distintas plantas superiores y microalgas (Gómez-García, Losada et al. 2006), estas enzimas no están bien caracterizadas aún. En plantas tan sólo se conoce la localización subcelular de AtPPA6, una sPPasa similar a Ipp1p pero localizada en cloroplastos (Weiner 1987). Nuestro grupo publicó en 2010 un trabajo en el que se complementó la deficiencia de Ipp1p en levadura con una versión quimérica de AVP1, TcAVP1 (Drake, Serrano et al. 2010). En esta versión, al extremo N-terminal de AVP1 se añadió la región N-terminal de la H⁺-PPasa del protista *Trypanosoma cruzi* (péptido señal), lo cual altera la distribución subcelular de AVP1, que de esta forma se localiza preferentemente en las membranas internas de la levadura (Hill, Scott et al. 2000).

Como se describe a lo largo de este trabajo, el metabolismo del PPI es muy importante en el compartimento nuclear dónde probablemente esté altamente regulado, sin embargo, no existen evidencias de la presencia de sPPasas en este compartimento en el caso de las células vegetales. Tan sólo se han encontrado indicios de la presencia de la sPPasa cloroplástica en núcleo mediante un análisis masico de proteómica nuclear de células de *Oryza sativa* (Choudhary, Basu et al. 2009).

Dada la sencillez de su estructura, las H⁺-PPasas son consideradas bombas de protones primitivas en contraste a la complejidad de estructura de las V-ATPasas (Drozdowicz and Rea 2001). En el tonoplasto de células vegetales coexisten ambas bombas de protones, lo que genera un interrogante sobre el significado fisiológico de esta redundancia funcional (Schumacher 2006). Recientemente nuestro grupo ha publicado un trabajo en el que, utilizando la levadura como modelo de célula eucariota, se ha complementado la deficiencia de V-ATPasa con la versión modificada de TcAVP1, TcGFPAVP1 (Perez-Castiñeira, Hernandez et al. 2011). En esta versión, además de sustituir el extremo N-terminal de AVP1 por el extremo N-terminal de la H⁺-PPasa de *T. cruzi*, se ha añadido la secuencia codificante para la GFP tras la región N-terminal Tc, lo que permite una mayor estabilidad y expresión de la proteína.

Aunque se ha demostrado que TcGFPAVP1 es capaz de complementar la deficiencia en V-ATPasa, ésta no es posible en presencia de la sPPasa endógena Ipp1p. Según datos cinéticos Ipp1p tiene una K_m de 1,3 µM (Salminen, Parfenyev et al. 2002), mientras que la K_m de AVP1 es de 130 µM (Maeshima 1991), lo que indicaría una mayor afinidad de la sPPasa por el sustrato. Posiblemente, en estas condiciones, existe una alta competencia por el sustrato Mg²⁺·PPi entre Ipp1p y TcGFPAVP1, de manera que la ausencia de sustrato disponible para la H⁺-PPasa impediría la acidificación de la vacuola y la capacidad de complementar la deficiencia en V-ATPasa. Estos resultados sugieren que es incompatible la presencia simultánea de sPPasas y H⁺-PPasas en el citosol. Sin embargo, no descartan un posible modelo del metabolismo del PPi en las células vegetales en el que coexistieran H⁺-PPasas en el citosol y sPPasas compartimentalizadas en el núcleo, compartimentos comunicados selectivamente por los poros nucleares, además de en cloroplastos y mitocondrias.

Se decidió comprobar si TcGFPAVP1 es capaz de complementar la deficiencia de V-ATPasa en presencia de una sPPasa preferencialmente localizada en el núcleo. Para ello, se co-transformó la cepa mutante YPC3 con una construcción en el vector pRS1024 que expresa la quimera TcGFPAVP1 bajo el control del promotor Met25, y con las construcciones utilizadas en el apartado 3.2: control, IPP1-NES e IPP1-NLS. De esta manera se obtuvieron cepas que expresaban TcGFPAVP1 en la membrana vacuolar y variantes de Ipp1p localizadas de manera nativa (núcleo-citosólica), o compartimentalizada en citosol o núcleo, respectivamente. Estas cepas junto con otras cepas control, en las que YPC3 se transformó con cada construcción independiente, se cultivaron en medio selectivo con glucosa y se analizó su crecimiento mediante un

ensayo típico de goteo en placa tanto en condiciones control (YPD pH 5,6 vs. YPD pH 7,5) como en condiciones de inhibición química de la V-ATPasa (YPD pH 7,5 + 2 μ M bafilomicina A1). Como se observa en la Figura 3.4.1, la construcción TcGFPAVP1 complementa la deficiencia en V-ATPasa en el transformante que expresa IPP1-NLS, pero no con ninguna de las otras construcciones, que expresan variantes de Ipp1p esté presentes en el citosol, incluso con una mayor eficiencia de complementación que la cepa TcGFPAVP1 usada como control.

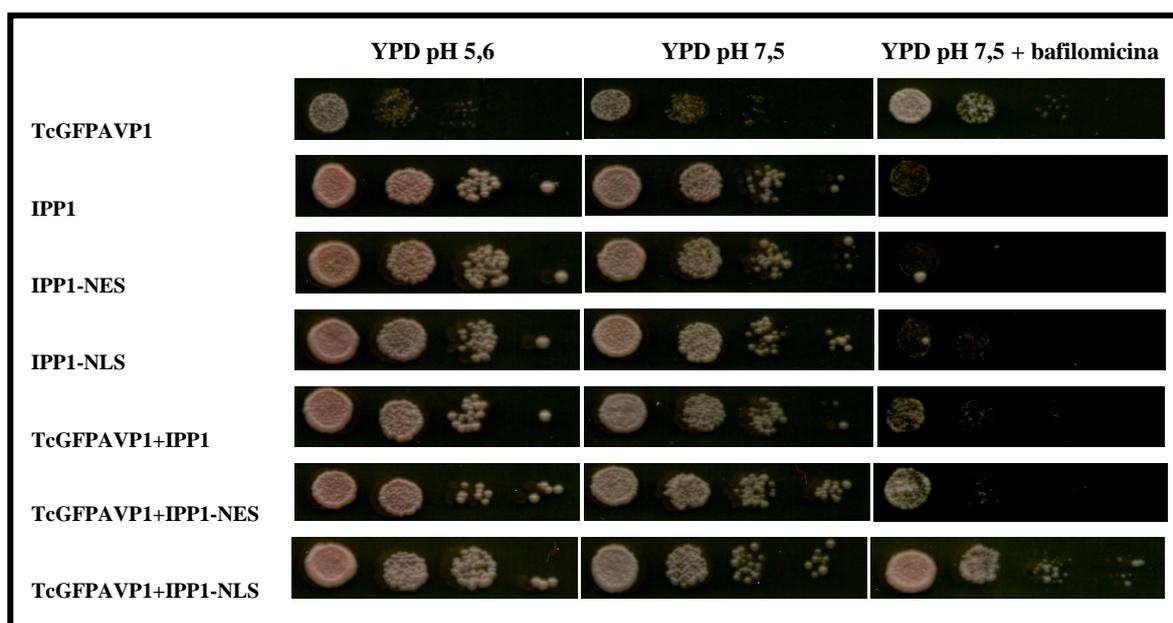
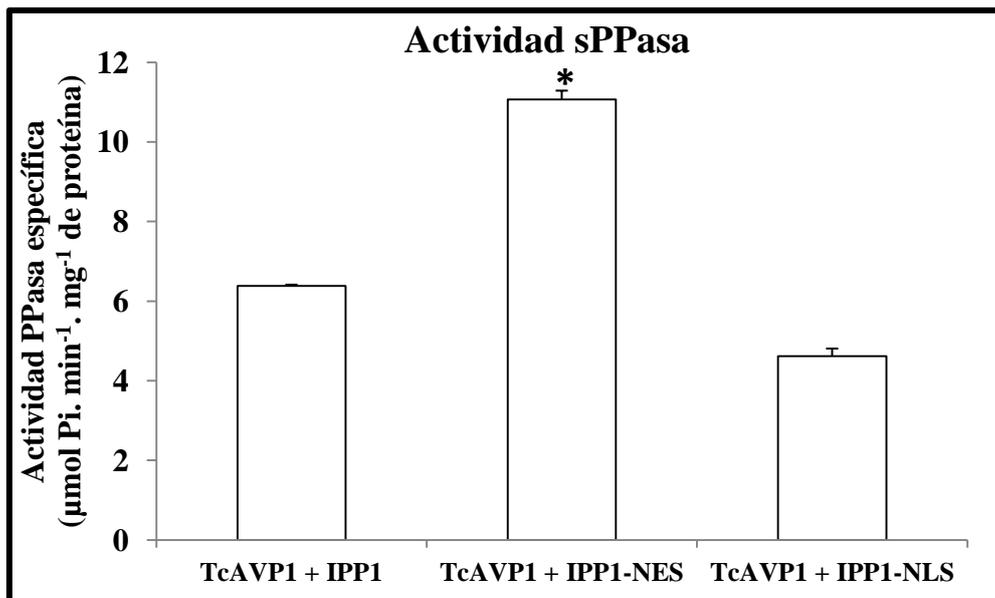


Figura 3.4.1: Complementación funcional de la deficiencia en V-ATPasa por una H⁺-PPasa quimérica (TcGFPAVP1) co-expresada con Ipp1p en diversas localizaciones subcelulares. Crecimiento comparativo de las distintas cepas en condiciones control (YPD pH 5,6 e YPD pH 7,5) y en condiciones de inhibición de la V-ATPasa (YPD pH 7,5 + 2 μ M bafilomicina A1). Se realizaron diluciones seriadas (10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4) de cada cultivo en agua estéril y posteriormente 2,5 μ l de cada una de ellas se llevaron a placas, observándose el crecimiento al cabo de tres días.

Las diferentes cepas se cultivaron en medio selectivo con glucosa y se obtuvieron las fracciones soluble y de membrana, en las que se midieron las actividades específicas PPasa asociada a membrana y la PPasa soluble, respectivamente (Figura 3.4.2). Los niveles de actividad específica PPasa en las fracciones solubles mostraron un aumento en el caso de la cepa IPP1-NES y una disminución en la cepa IPP1-NLS, respecto a la actividad sPPasa de la cepa control. El mismo patrón se observó en las cepas estudiadas en el apartado 3.2 (control, IPP1-NES, IPP1-NLS), indicando que la presencia de una H⁺-PPasa no afecta a los niveles de expresión de la sPPasa Ipp1p, independientemente de su localización subcelular. Por el contrario, al medir la actividad

específica PPasa en fracciones de membrana, se observó un importante aumento de los niveles de actividad de la H⁺-PPasa cuando ésta se co-expresa con una sPPasa localizada en núcleo, sugiriendo una posible regulación de las H⁺-PPasas en función de la presencia o ausencia de una sPPasa citosólica.

A



B

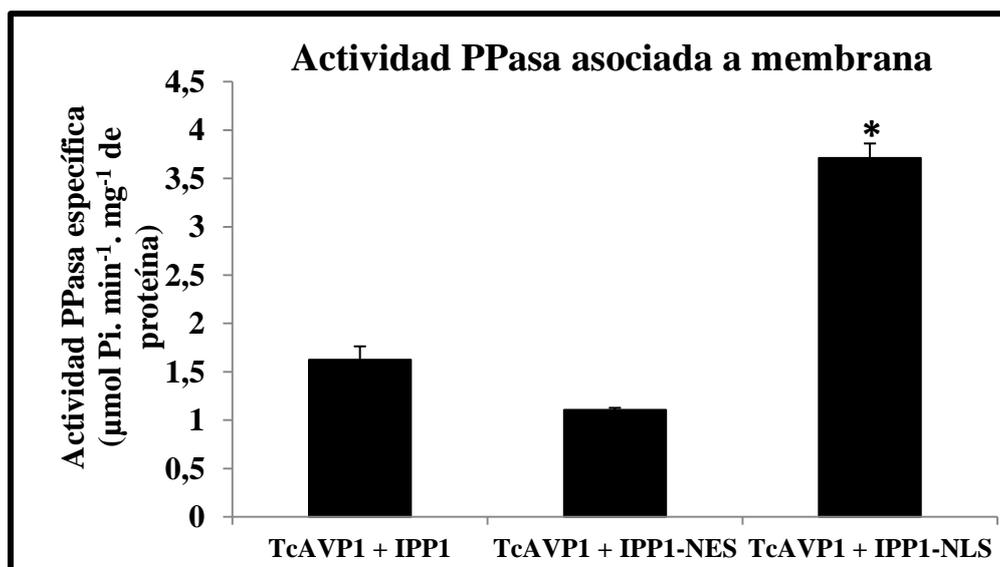


Figura 3.4.2: Niveles de actividad PPasa en las fracciones soluble (A) y de membranas (B) en las diferentes cepas que co-expresan TcGFP_{AVP1} y variantes de Ipp1p con diferentes localizaciones subcelulares. Se muestran medias de tres experimentos independientes con sus errores estándar. El asterisco indica una diferencia significativa en el test de Student con un valor de $P < 0,05$.

4. DISCUSIÓN

4.1. Mecanismo fisiológico de la toxicidad por exceso de PPi en el modelo eucariota *Saccharomyces cerevisiae*

Aunque existen numerosos trabajos investigación sobre metabolismo celular, no existe aún una información completa sobre las consecuencias celulares de algunos circuitos metabólicos básicos, siendo uno de ellos el metabolismo del PPi. Aunque se conoce que el PPi está involucrado en la reabsorción ósea (Rogers, Gordon et al. 2000), se sospecha que juega un papel importante en cáncer (pues existe un aumento de los niveles de expresión de PPA1 en células tumorales) y que, en general, afecta a casi todos los aspectos del anabolismo celular, aún se desconocen los efectos a nivel celular de la alteración de la homeostasis del PPi. Aunque eucariotas y bacterias presentan diferencia obvias, se asume que la escasa información disponible relacionada con los niveles de PPi en *E. coli* es válida y extensible a eucariotas, por lo que se considera que, en general, un exceso de PPi en la célula genera una parada del crecimiento celular debido a una inhibición total del anabolismo y que, como se ha demostrado en esta bacteria, esta situación es reversible si se retira el exceso de PPi del interior celular (Chen, Brevet et al. 1990). En este trabajo se ha constatado un escenario muy diferente sobre el efecto del exceso de PPi en células eucariotas, pues se ha demostrado que en levadura, la inhibición de la actividad sPPasa citosólica genera muerte celular, exclusivamente de células que obtienen energía principalmente a través de la fermentación, pero no en aquellas que desarrollan un metabolismo respiratorio (parada del ciclo celular). Además se ha demostrado que la muerte celular está acompañada de una parada del ciclo celular en fase G₁/G₀ y que tanto la inducción de muerte como la parada de ciclo celular son efectos producidos por la inhibición de la actividad sPPasa de manera irreversible, incluso una posterior eliminación del exceso del PPi intracelular.

En levadura, a diferencia de lo que ocurre en la respiración, las células que realizan fermentación mantienen un delicado equilibrio redox: por un lado las concentraciones celulares de coenzima nicotinamida son muy bajas ($[NAD^+] + [NADH]$ es igual a 1 mM), de manera que la mayor parte de coenzima NAD⁺(H)/NADH citosólica esta probablemente destinada a mantener el equilibrio entre su forma reducida y oxidada en la glucolisis; por otro lado, este proceso es estequiometricamente rígido, por ejemplo, la capacidad de oxidar NADH por la reducción de acetaldehído usando la alcohol deshidrogenasa es equivalente a la que previamente se tuvo que utilizar para

reducirse por la gliceraldehído-3-deshidrogenasa, poniéndose de manifiesto la limitación celular para mantener la relación NAD^+/NADH a través del metabolismo en condiciones fermentativas. Esto significa que existe una constante necesidad celular de coenzima NAD^+ que tiene que ser resuelta a través de la biosíntesis de nuevas moléculas. Es importante destacar que en la célula existen varias reacciones que consumen NAD^+ y que eventualmente lo destruyen, como por ejemplo las reacciones catalizadas por las ADP-ribosa transferasas, cADP-ribosa sintasas, sirtuinas y, en el caso de mamíferos, las poli(ADP-ribosa) polimerasas (Guarente 2000; Ziegler and Oei 2001). En el caso de mamíferos se ha demostrado que, bajo algunas condiciones, como por ejemplo cuando se producen daños en el DNA por tratamiento con drogas genotóxicas, estos procesos pueden incluso agotar el contenido celular de NAD^+ (Kirkland 2010). Existen dos vías diferentes para la biosíntesis de NAD^+ : la vía de reciclaje y la vía “*de novo*”. En ambas existen reacciones que generan PPi como subproducto, por lo que este metabolito puede actuar como un eficaz inhibidor en ambos procesos. Notoriamente, el paso limitante en la ruta de biosíntesis de NAD^+ , que comparten tanto la vía de reciclaje como la vía “*de novo*”, la adenilación del ácido nicotínico mononucleótido (NaMN), es una reacción reversible entre las primeras que se describieron como sensibles al exceso de PPi (Heinonen 2001). Además, la transferencia de un grupo fosforribosil para producir nicotinamida/NaMN y PPi en la vía de reciclaje de biosíntesis de NAD^+ , es también una reacción reversible (Takahashi, Nakamura et al. 2010), que se considera la vía de reciclaje principal de biosíntesis del NAD^+ en levaduras (Lu and Lin 2010). Las células tumorales presentan una situación metabólica muy similar a la que tienen lugar en las levaduras que llevan a cabo un metabolismo fermentativo (Diaz-Ruiz, Uribe-Carvajal et al. 2009), a diferencia de lo que ocurre en las células somáticas, que presentan una situación metabólica más similar a la que se produce en levaduras que desarrollan una intensa respiración. El efecto Warburg es el resultado de la dependencia de las células tumorales de la fermentación láctica del piruvato para obtener energía. Las células somáticas normales, por el contrario, tras el proceso glucolítico oxidan el piruvato en la mitocondria mediante respiración aeróbica (Diaz-Ruiz, Uribe-Carvajal et al. 2009). La fermentación láctica en células animales es también una estrategia para equilibrar los equivalente redox formados en las etapas iniciales de la glucólisis, y es en todos los aspectos similar a la producción de etanol llevada a cabo por la levadura. La alta tasa de recambio

metabólico del balance NAD^+/NADH en las células tumorales, unida a la rigidez de la reoxidación de NADH para obtener NAD^+ , ha estimulado el interés por los inhibidores de la biosíntesis de esta coenzima, en relación con este aspecto, se ha publicado recientemente que la caída drástica de los niveles de NAD^+ por la inhibición de la actividad nicotinamida fosforibosiltransferasa, mediada por el compuesto FK866 induce muerte celular por autofagia (Billington, Genazzani et al. 2008; Bruzzone, Fruscione et al. 2009). Estos datos, unidos a los resultados obtenidos en este trabajo, han hecho proponer la inhibición de la sPPasa citosólica como una alternativa para inducir específicamente la muerte celular por autofagia en células tumorales. Una solución podría ser el uso de bisfosfonato ya que desde hace mucho tiempo se conoce su efecto inhibidor sobre las sPPasas, y actualmente, se está estudiando su actividad antitumoral (Holen and Coleman 2010; Morgan and Lipton 2010). Sería interesante determinar la implicación de la inhibición de la biosíntesis de NAD^+ en el mecanismo antitumoral de estos fármacos; alternativamente, se podrían analizar nuevos bisfosfonatos para obtener una inhibición más eficiente de la sPPasa con fines antitumorales.

Se ha demostrado que la restricción calórica alarga la edad cronológica (life-span) y afecta a muchos procesos celulares en todos los sistemas modelo excepto en plantas (Lu and Lin 2010). El mecanismo más aceptado implica el incremento de la concentración intracelular de NAD^+ a partir de NADH . Un exceso de NAD^+ hace que enzimas como las sirtuinas o las histonas desacetilasas dependientes de NAD^+ dejen de estar reprimidas, lo que genera la alteración de la expresión de genes a través de silenciamiento transcripcional y en consecuencia, cambios en la edad cronológica de las células. En levadura, la presencia de glucosa a una concentración baja (0.5 %) es suficiente para inducir un metabolismo mixto entre fermentación y respiración que ayuda a mantener un alto balance NAD^+/NADH y un incremento de la edad cronológica (Lin, Kaeberlein et al. 2002; Lin, Ford et al. 2004). En este trabajo se ha demostrado que el aumento de la disponibilidad celular de NAD^+ , en condiciones de inhibición de la sPPasa *Ipp1p*, reduce la inducción de autofagia y la consiguiente muerte celular. Sin embargo, se ha observado que la restricción calórica no es en sí misma suficiente para incrementar la supervivencia o disminuir la inducción de muerte celular. Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de una NADH -oxidasa alternativa, *Nqr1p*, sólo es capaz de reducir la inducción de muerte celular en condiciones de restricción calórica. Todo esto sugiere que la homeostasis de coenzimas de nicotinamida necesaria

para impedir la inducción de muerte celular debe estar fuertemente orientada hacia la biosíntesis de NAD^+ o la reoxidación de NADH, por ejemplo en presencia de altas concentraciones de acetaldehído, y que otras estrategias menos agresivas como la restricción calórica o la sobreexpresión de una NADH-oxidasa alternativa son eficientes sólo cuando ocurren en combinación.

Aunque la muerte celular esta normalmente acompañada de una parada previa de ciclo celular, un efecto inhibitorio general del anabolismo por un exceso de PPi puede ser entendido como una parada asincrónica de las funciones celulares. El presente trabajo muestra que bajo condiciones tanto fermentativas (SG y CR) como respiratorias (MR), la parada del ciclo celular es parte de las respuestas celulares a la inhibición de la sPPasa citosólica. En el caso de las células con metabolismo fermentativo, la parada del ciclo celular se produce en fase G_0/G_1 , lo que podría ser una respuesta a una aparente deficiencia en coenzimas de nicotinamida que induciría a su vez la muerte celular por autofagia. En el caso de las células cultivadas con glicerol como fuente de carbono, la parada del ciclo celular en fase S sugiere que la duplicación del DNA es, junto con la biosíntesis de coenzimas de nicotinamida, uno de los procesos bioquímicos más sensibles a un exceso de PPi intracelular.

En resumen, este trabajo representa el primer estudio a nivel celular y molecular sobre la alteración de la homeostasis del PPi en eucariotas, y describe sus efectos sobre el ciclo celular así como la inducción de muerte celular. Estos datos tienen gran importancia para entender los procesos celulares afectados por el exceso de PPi , así como para diseñar nuevas aproximaciones contra el cáncer y enfermedades óseas.

4.2. Implicaciones celulares y moleculares de la localización núcleo-citosólica de la sPPasa Ipp1p de *Saccharomyces cerevisiae*

En este trabajo se ha determinado por primera vez la localización núcleo-citosólica de la sPPasa mayoritaria en levaduras, Ipp1p, que hasta la fecha considerada una proteína exclusivamente citosólica. Tan sólo dos trabajos previos relacionan las sPPasas con procesos nucleares. Uno de ellos describe que la sPPasa de *Drosophila melanogaster*, NURF38, es de localización nuclear y forma parte del complejo remodelador de la cromatina NURF. Esta proteína posee el motivo PROSITE que

define a la sPPasas arquetípicas de la Familia I así como los 13 residuos de aminoácidos conservados que forman parte del sitio activo (Gdula, Sandaltzopoulos et al. 1998). En el otro trabajo, un estudio de proteómica masiva con núcleos de *Oryza sativa* realizado por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), ha detectado la presencia de la sPPasa cloroplástica en el núcleo, e incluso han determinado un incremento de su expresión durante la respuesta a condiciones de deshidratación (Choudhary, Basu et al. 2009). Sin embargo, hasta hoy no existía ningún trabajo exhaustivo en el que se haya estudiado la relevancia fisiológica de la presencia de sPPasas en el compartimento nuclear de eucariotas, y que hasta ahora estas enzimas eran consideradas proteínas citosólicas o de estricta localización en orgánulos energéticos como mitocondrias y cloroplastos, o proteínas citosólicas.

El núcleo es un compartimento en el que se ocurren tanto reacciones anabólicas como degradativas esenciales para la célula, algunas de las cuales generan PPi como subproducto y otras, por el contrario, requieren este metabolito para llevarse a cabo de forma eficiente. Una de las enzimas esenciales, es la DNAPolimerasa que cataliza la adición de desoxiribonucleótidos a una cadena de DNA durante la replicación mediante la transferencia de un grupo fosfato y generando PPi, simultáneamente al alargamiento del DNA al formarse un nuevo enlace fosfodiéster. Además de la catálisis de esta reacción, la DNAPolimerasa cataliza otras reacciones como la pirofosforólisis, o reacción inversa de la replicación, consistente en la liberación de dNTPs del extremo 3' de una estructura molde/iniciador mediante la adición de PPi inorgánico como sustrato, una reacción fundamental para corregir los errores producidos durante la replicación evitando así mutaciones (Deutscher and Kornberg 1969). La coexistencia en el mismo compartimento subcelular de reacciones anabólicas que liberan PPi y reacciones catabólicas que requieren este metabolito, convierte a los niveles de PPi en moduladores bioquímicos de los dos tipos de reacciones esenciales sobre las que este metabolito actúa de forma antagónica, y plantea la hipótesis de la existencia de un estricto control de los niveles de PPi en el compartimento nuclear. En el citosol, por el contrario, la mayoría de reacciones en las que participa el PPi inorgánico son reacciones anabólicas que generan este metabolito como subproducto. Como se ha comprobado en este trabajo, uno de los principales procesos afectados por el exceso de PPi al inhibir a la sPPasa citosólica es la reducción de la síntesis de NAD⁺, un proceso exclusivamente citosólico. Sin embargo, dada la ausencia de reacciones que requieran PPi en el citosol,

se puede plantear la hipótesis de que una disminución de los niveles de PPi en dicho compartimento no supondría ningún problema para la células, y que su regulación no tendría que ser tan exhaustiva como en el compartimento nuclear.

Además de comprobar la localización núcleo-citosólica que presenta Ipp1p y de precisar la preferente ubicación citosólica de la proteína nativa se han generado cepas que expresan esta enzima exclusivamente en el núcleo (IPP1-NLS) o en el citosol (IPP1-NES), como herramientas para determinar el efecto de una compartimentalización estricta de esta sPPasa mayoritaria. A nivel de proteína se observó un incremento considerable, tanto de la actividad específica PPasa como del contenido de proteína Ipp1p en el caso de localización preferencial en el citosol celular; por el contrario, se observó un descenso especialmente de los niveles de proteína en el caso de su confinamiento nuclear. Estos datos apoyan la hipótesis de la existencia de una estricta regulación a nivel nuclear de Ipp1p. Con la generación de la cepa mutante, IPP1::NLS*, que expresaba una sPPasa compartimentalizada en núcleo carente de actividad PPasa al estar mutada en dos residuos de aspártico esenciales para la catálisis, se ha demostrado que la probable regulación nuclear de Ipp1p es dependiente de su actividad catalítica (y, por tanto, de los niveles de su sustrato, PPi, en este compartimento subcelular) y no de los niveles del polipéptido en sí mismo, ya que al analizar los niveles de proteína en esta cepa se observaron valores incluso superiores a los encontrados para la cepa control, indicando la ausencia de este tipo de regulación en el citosol.

Dos de los niveles más frecuentes de regulación de proteínas son a nivel de su síntesis o transcripción del polipéptido, o a nivel de degradación de la proteína. Para comprobar si la regulación de Ipp1p se produce a nivel de su biosíntesis se analizaron los niveles de transcrito del gen *IPP1* mediante RT-PCR, no observándose ninguna diferencia y descartando la hipótesis de una regulación a nivel transcripcional de Ipp1p. La segunda posibilidad se basó en una posible regulación de la degradación de la sPPasa. La degradación de proteínas en eucariotas se puede realizar a través de dos mecanismos altamente conservados, proteólisis en compartimentos ácidos (lisosomas en metazoos, vacuola en levaduras) y degradación vía proteasoma nuclear y/o citosólico (Lecker, Goldberg et al. 2006). Para comprobar esta hipótesis se analizaron tanto los niveles de Ipp1p como la actividad específica PPasa en cepas mutantes afectadas en

alguna de las posibles vías de degradación -mutante en el proteasoma nuclear (NA25, mutante termosensible), mutante en el proteasoma de retículo endoplasmático y citosol (WCGY4-11/22a) y mutante en degradación vacuolar (SAH12, *pep4Δ*)- y se compararon con los datos obtenidos para las correspondientes cepas silvestres. Tan solo se observó incremento, tanto de los niveles de Ipp1p como la actividad específica PPasa en la cepa mutante afectada en el proteasoma nuclear, indicando que existe una regulación de Ipp1p a nivel de degradación de proteína que es además específica de núcleo pues depende del proteasoma localizado en dicho compartimento subcelular. La vía proteasómica utiliza normalmente el marcaje de la proteína con ubiquitina, una pequeña proteína de 76 aminoácidos (Jonkers and Rep 2009). Este marcaje explicaría la heterogeneidad de bandas que aparecen al analizar los niveles de Ipp1p mediante *Western blot* en la cepa mutante IPP1-NLS. Además en la literatura existen evidencias proteómicas sobre una interacción física entre Ipp1p y la ubiquitina 4 (Ubi4p) implicada en la degradación vía proteasoma (Ziv, Matiuhin et al. 2011; Starita, Lo et al. 2012), apoyando la posibilidad de que este marcaje post-traducciona l de Ipp1p sea requerido para ser degradada por el proteasoma nuclear. Otro abordaje llevado a cabo durante este trabajo fue determinar la estabilidad proteica de Ipp1p en cepa con su localización subcelular alterada. Para ello se realizó un ensayo de pulso y caza con marcaje radiactivo usando metionina-³⁵S, que proporcionó como resultado una clara inestabilidad de Ipp1p exclusivamente cuando ésta se confinaba en el núcleo. De esta forma se reafirma la hipótesis inicial de una regulación nuclear de Ipp1p mediante degradación a nivel de proteasoma y posiblemente mediada por una modificación post-traducciona l a través de marcaje con la ubiquitina Ubi4p.

Como se ha comprobado en este trabajo, la deficiencia de Ipp1p en levaduras en condiciones fermentativas produce muerte celular por autofagia debido a la inhibición de la síntesis de NAD⁺ por un exceso de PPI. Dada la disminución de los niveles de Ipp1p con respecto al control en la cepa IPP1-NLS, se planteó la hipótesis de una mayor susceptibilidad a la autofagia de esta cepa. La reducción de la tasa de crecimiento, en condiciones de inducción de autofagia (hambre de nitrógeno), exclusiva de la cepa en la que Ipp1p se confina en el núcleo, apoya la hipótesis planteada y abre una nueva línea de trabajo enfocada a corroborar la mayor susceptibilidad de la cepa IPP1-NLS a la autofagia, y a determinar si es la inhibición de la síntesis de NAD⁺ por el exceso de PPI el mecanismo molecular implicado. La reducción de la tasa de crecimiento de la cepa

IPP1-NLS en condiciones de hambre de nitrógeno, también está indicando una reducción de la edad cronológica celular (*chronological life span*), el periodo de tiempo en el que las células de cultivos en fase estacionaria permanecen viables. Esto es de especial relevancia, al relacionar la localización subcelular de la sPPasa mayoritaria en levadura con el envejecimiento celular (Fabrizio, Hoon et al. 2010).

Respecto al efecto fenotípico de la compartimentación de Ipp1p en núcleo o citosol, aunque se analizó la sensibilidad/resistencia a diferentes drogas que afectan a procesos nucleares como camptotecina (rotura de DNA de cadena simple) (Lotito, Russo et al. 2009), doxorubicina (rotura de DNA de cadena doble) (Xia, Jaafar et al. 2007), y radiación UV (mutaciones puntuales) (Lemontt 1971), no se apreciaron diferencias de sensibilidad/resistencia entre las diferentes cepas mutantes en las condiciones de cultivo estándar. Ésto es posiblemente debido a que, aunque se confine Ipp1p en el núcleo y a diferencia de lo que ocurre cuando se localiza en el citosol, la célula regula estrictamente los niveles de esta proteína en el compartimento nuclear, manteniéndolos en un valor reducido de manera que no se vean afectados procesos nucleares dependientes de PPi.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis inicial de que los niveles de PPi en el compartimento nuclear deben estar estrictamente regulados, manteniéndose en un rango adecuado para el correcto funcionamiento de unas reacciones que lo generan (p.e., polimerización del RNA y/o DNA) y de otras que lo usan como sustrato (p.e., pirofosforólisis, reacción reversa de las DNA polimerasas por la que corrigen mutaciones). El nivel de PPi nuclear conllevaría, por tanto, un compromiso entre dos clases de reacciones bioquímicas esenciales sobre las que este metabolito actúa de forma antagónica, de ahí la necesidad de su estricto control en este compartimento subcelular.

4.3. Expresión y localización subcelular de sPPasas de diferentes orígenes en levadura y células de mamífero

En esta línea de trabajo se llevaron a cabo experimentos encaminados a expresar y determinar la localización subcelular de sPPasas de diferentes organismos (microorganismos y plantas) y con distintas localizaciones subcelulares nativas (citosol,

plástidos, mitocondrias) en dos sistemas eucarióticos modelo: levadura y líneas celulares de mamíferos. Aunque las sPPasas pueden dividirse en dos Familias, I y II, altamente diferenciadas tanto en estructura como en secuencia, todas presentan una conformación espacial del sitio activo y un mecanismo catalítico análogos (Gomez Garcia, Poort et al. 2001). Pese a esta división de las sPPasas, estas proteínas están consideradas en su conjunto un ejemplo de evolución convergente consecuencia del proceso de sustitución funcional de las sPPasas arquetípicas ancestrales (Familia I) ocurrido en la evolución de algunos procariotas (Gomez-Garcia and Serrano 2002).

En el caso de levadura, se expresaron heterológamente nueve sPPasas en el mutante YPC3 (ocho de la Familia I y una de la Familia II), con el fin de evitar la co-expresión con la sPPasa endógena mayoritaria de *S. cerevisiae*. Tres de las sPPasas utilizadas son propias de la levadura, ScIPP1, ScIPP2 e ScIPP2* (Lundin, Baltscheffsky et al. 1991; Kolakowski, O'Neill et al. 1998), siendo esta última una versión modificada de la sPPasa mitocondrial sin el péptido de tránsito. Como ejemplo de sPPasa de mamífero se eligió la sPPasa ortóloga de Ipp1p de humanos, HsPPA1 (Yang and Wensel 1992). Además, se expresaron tres sPPasas de la planta *A. thaliana*: AtPPA1, cuya localización subcelular nativa es desconocida aunque se expresa en todos los tejidos de esta planta; AtPPA6, la sPPasa cloroplástica y AtPPA6* correspondiente a esta sPPasa sin su péptido de tránsito (Reddy, Ali et al. 2002). Como ejemplo de sPPasa procariótica perteneciente a la Familia I, se utilizó la sPPasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, SyPPA. Finalmente como única sPPasa de la Familia II, se expresó la sPPasa de la actinobacteria gram positiva *Streptococcus mutans*, SmPPA (Merckel, Fabrichniy et al. 2001). Además en el caso de la expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, se determinaron otros parámetros para las diferentes sPPasas utilizadas, como su capacidad de complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p o su efecto sobre la tasa de crecimiento de los cultivos.

En general se observó una buena correlación entre los niveles de expresión (intensidad de fluorescencia yEGFP *in vivo* y los niveles de proteína y actividad sPPasa específica), así como la capacidad de complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p y la tasa de crecimiento. Ello indica un paralelismo entre las tasas de crecimiento y de proliferación celular y, los niveles de sPPasa en la célula. Este resultado está apoyado por otros obtenidos durante este trabajo, como la incapacidad de crecimiento y

proliferación del mutante YPC3 (Apdo. 3.1), o la disminución de la tasa de crecimiento en la cepa IPP1-NLS, la cual mostraba menores niveles de la sPPasa que la cepa control (Apdo. 3.2). La única excepción observada fue ScIPP2, la sPPasa mitocondrial endógena, la cual mostró una alta tasa de expresión pero fue incapaz de complementar el mutante YPC3. Ésto puede explicarse por la esperable compartimentalización de esta sPPasa en mitocondrias que le impide acceder al *pool* de PPi citosólico. Como era de esperar, en este caso tampoco se observó inicialmente crecimiento celular, sin embargo, tras 26 h de cultivo, las células retomaron progresivamente el crecimiento. Es posible que por la saturación del sistema de importación al compartimento mitocondrial, debido a la expresión de la sPPasa quimérica desde un vector multicopia. De cualquier modo, como se puede observar en los resultados obtenidos para la cepa expresora de ScIPP2 sin péptido de tránsito, la eliminación de esta secuencia *N*-terminal, genera una proteína citosólica totalmente estable, capaz de complementar al mutante YPC3.

Se puede establecer una segunda correlación entre los parámetros analizados (niveles de expresión, tasa de crecimiento y capacidad de complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p) y el origen endógeno o exógeno de la sPPasa. En el único caso en el que no se mantuvo esta correlación fue en la sPPasa exógena SmPPA, la cual presentó una tasa de crecimiento y una capacidad de complementación de la deficiencia en Ipp1p muy similar a la sPPasa endógena *ipp1p*, e incluso mostró una mayor actividad específica sPPasa en sus condiciones óptimas (preincubación con MnCl₂). Ésto puede deberse a que, aunque se trata de la sPPasa más alejada filogenéticamente a Ipp1p, es una sPPasa Familia II, las cuales son entre 20 y 50 veces más eficientes en el proceso catalítico que las sPPasas Familia I (Zyryanov, Tammenkoski et al. 2004).

La cepa transformada con la sPPasa cloroplástica de *A. thaliana* AtPPA6 no mostró ninguna fluorescencia mediante microscopia, y al igual que en el mutante YPC3 carente de Ipp1p, no se observó crecimiento celular en glucosa. Sin embargo, al analizar su actividad específica sPPasa en extractos celulares, se observaron niveles que duplicaban los obtenidos para los extractos de células expresoras de la sPPasa endógena ScIPP1. Un resultado similar se obtuvo para los niveles de proteína, pero obteniéndose en el *Western blots* una banda de aproximadamente 35 kDa, próximo al de la proteína AtPPA6 madura. Este resultado indicaría la expresión de una forma procesada de la proteína quimérica, en la que el dominio catalítico de la sPPasa se ha

desprendido de la proteína yEGFP (la quimera tiene un tamaño de 70 kDa), y que es incapaz de acceder al *pool* de PPI citosólico, posiblemente por la compartimentalización de la proteína procesada. La desaparición de la banda de 35 kDa en el *Western blot* de extractos celulares totales del mutante en proteasas vacuolares BJ5459 transformado con la construcción expresora de esta sPPasa quimérica, indicaría que la levadura la está dirigiendo a la vacuola. En este compartimento sería procesada por las proteasas vacuolares hasta una forma sPPasa madura funcional, pero incapaz de acceder al *pool* de PPI citosólico y por tanto incapaz de mostrar crecimiento celular. El hecho de que exista expresión de esta sPPasa vegetal, así como crecimiento celular y complementación de la deficiencia de *Ipp1p*, en la cepa que expresa *AtPPA6* sin péptido de tránsito, podría señalar a este motivo como el responsable de que la levadura dirija a esta sPPasa al compartimento vacuolar, posiblemente por no reconocerlo como propio.

En el caso de células de mamífero, se expresaron heterológamente en fibroblastos humanos cinco de las nueve expresadas previamente en levadura: *ScIPP1*, *HsPPA1*, *AtPPA1*, *AtPPA6** y *SmPPA*. En todos los casos se observó expresión mediante aparición de fluorescencia yEGFP *in vivo* al analizar las células bajo el microscopio. Se volvió a observar la misma correlación entre los niveles de expresión y el origen endógeno o exógeno de la sPPasa, de manera que la sPPasa que mostró una mayor fluorescencia yEGFP fue la sPPasa endógena *HsPPA1*.

El conjunto de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo ponen de manifiesto que la alta homología tanto en la conformación espacial del sitio activo como del mecanismo catalítico permite intercambiar sPPasas de diversas procedencias en sistemas eucarióticos modelo como levadura o células de mamífero. El único inconveniente que claramente evita un intercambio funcional es que presenten un péptido de tránsito para orgánulos, como en el caso de las sPPasas localizadas de manera nativa en mitocondria y cloroplasto. En estos casos, la simple eliminación mediante ingeniería genética de este motivo de la secuencia nativa permite en todos los casos analizados un intercambio funcional eficiente entre las sPPasas de orgánulos y citosol.

4.4. Reproducción del escenario metabólico del PPi de células vegetales utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota

Estudios previos han reproducido en la levadura *S. cerevisiae*, un escenario metabólico del PPi similar al que existe en células vegetales (Perez-Castineira, Lopez-Marques et al. 2002; Drake, Serrano et al. 2010). En estos trabajos se consigue la ausencia de una sPPasa citosólica que normalmente es letal, de modo que el PPi generado en el anabolismo es hidrolizado eficientemente por las H⁺-PPasas con el consiguiente bombeo de protones a través de la membrana en la que se localiza. Otro trabajo reciente ha dado un paso más, demostrando la complementación de la deficiencia en V-ATPasas en levaduras con una H⁺-PPasa de origen vegetal (Perez-Castineira, Hernandez et al. 2011). Los resultados obtenidos indican que la ausencia de sPPasa citosólica es un requerimiento absoluto para lograr la complementación de la deficiencia en V-ATPasas por una PPasa de membrana.

Estos trabajos no contemplaban la posible presencia de una sPPasa nuclear en células vegetales. Sin embargo, en el genoma de *A. thaliana* existen seis genes que codifican para sPPasas, de los cuales sólo se conoce con certeza la localización cloroplástica de ATPPA6 (Weiner 1987). Debido a la incapacidad de complementar la deficiencia en V-ATPasa de las H⁺-PPasas cuando se coexpresan con sPPasas en el citosol de la célula, la posible localización subcelular del resto de sPPasas, se limitaría fundamentalmente al núcleo y las mitocondrias. En este sentido, existe un estudio de proteómica masiva sobre núcleos de *Oryza sativa*, en el que se ha detectado la presencia de una sPPasa (Choudhary, Basu et al. 2009). Estos datos, unidos a los obtenidos en este trabajo que sugieren la existencia de una sPPasa nuclear en levadura, inducen a plantear un nuevo escenario metabólico del PPi en células vegetales, compatible con lo propuesto anteriormente. En este nuevo escenario metabólico, la hidrólisis del PPi citosólico estaría fundamentalmente ejecutada por H⁺-PPasas, mientras que los niveles de PPi en compartimentos como núcleo, mitocondrias y cloroplastos, estarían regulados por distintas sPPasas. Para reproducir dicho escenario metabólico en levadura se utilizó el mutante YPC3 que se transformó con dos construcciones, con el fin de co-expresar en la misma célula una H⁺-PPasa en la membrana vacuolar y una sPPasa confinada en el núcleo. La H⁺-PPasa utilizada fue AVP1, a la que se modificó mediante ingeniería genética sustituyendo su extremo N-terminal por el extremo N-terminal del protista *T.*

cruzi y añadiendo la secuencia codificante de la proteína GFP, dos modificaciones necesarias para permitir el correcto anclaje de la proteína a la membrana vacuolar y para aumentar su eficiencia de expresión (Drake, Serrano et al. 2010). La compartimentalización nuclear de Ipp1p se consiguió transformando el mutante YPC3 con la construcción IPP1-NLS, previamente utilizada en este trabajo (Apdo. 3.2). Para inhibir la V-ATPasa de *S. cerevisiae* se utilizó la inhibición química con bafilomicina A1, un inhibidor específico para V-ATPasas (Bowman, Siebers et al. 1988). La complementación de la deficiencia de V-ATPasas de esta cepa apoya nuestra propuesta sobre un posible nuevo escenario metabólico del PPi en células vegetales, demostrando la capacidad que tienen las H⁺-PPasas de complementar la deficiencia de V-ATPasa coexistiendo con una sPPasa siempre que ésta permanezca compartimentalizada, bien en orgánulos, como ya estaba demostrado previamente en mitocondrias y cloroplastos (Gomez-Garcia, Losada et al. 2006), o bien en el compartimento nuclear, como se demuestra en este trabajo.

A lo largo de este trabajo se ha realizado un análisis comparativo de la expresión de las sPPasa y H⁺-PPasa en cepas en las que co-existen TcGFPAVP1, e Ipp1p con distribución nativa, o compartimentalizada en núcleo o citosol. La similitud de los niveles de actividad PPasa soluble en estas cepas con los obtenidos en el apartado 3.2 para cepas que sólo expresan las sPPasas, sugieren que la expresión de estas últimas no se ve afectada por la co-existencia con una PPasa de membrana. Por el contrario, el aumento de la actividad PPasa de membrana en la cepa que coexpresa TcGFPAVP1 e IPP1-NLS, indica la existencia de una regulación negativa, posiblemente post-traducciona, de la H⁺-PPasa en función de la presencia simultánea de una sPPasa citosólica. Para comprobar esta hipótesis será necesario determinar tanto los niveles de proteína TcGFPAVP1 en cada cepa mediante *Western blot*, como los niveles de transcrito de la misma proteína mediante RT-PCR.

5. CONCLUSIONES

- 1. La ausencia de la sPPasa Ipp1p en la levaduras *S. cerevisiae* con metabolismo fermentativo genera muerte celular por autofagia, siendo uno de los mecanismos implicados el desbalance de la razón NAD^+/NADH debido a la inhibición de la síntesis de NAD^+ por el exceso de PPi.**
- 2. La ausencia de Ipp1p genera parada del ciclo celular en fase S en *S. cerevisiae* con metabolismo respiratorio. Esta parada es reversible si se retira el exceso de PPi y se reactiva la sPPasa.**
- 3. Ipp1p es una enzima núcleo-citosólica, cuyos niveles tanto de proteína como de actividad catalítica son menores en el compartimento nuclear que en el citosol. Esta diferencia se debe a una estricta regulación de los niveles proteicos de la Ipp1p nuclear, mediante degradación proteasómica. Esta regulación es dependiente de la actividad catalítica de hidrólisis de PPi y no de los niveles de polipéptido en sí.**
- 4. La alta homología tanto en la conformación espacial del sitio activo, como del mecanismo catalítico, permite intercambiar sPPasas de diversas procedencias y diferentes familias en sistemas modelo eucarióticos como levadura o células de mamífero.**
- 5. La compartimentalización nuclear de Ipp1p permite la eficiente complementación en levadura de la deficiencia en V-ATPasa mediante la expresión de una H^+ -PPasa localizada en la membrana vacuolar, pudiendo ser este un escenario metabólico del PPi similar al que tiene lugar en células vegetales.**

6. BIBLIOGRAFÍA

-
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- Ames, B. N. (1966). Assay if inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, Methods Enzymol 8.
- Ausubel, F. M., F. Katagiri, et al. (1995). "Use of Arabidopsis thaliana defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4189-4196.
- Baehrecke, E. H. (2005). "Autophagy: dual roles in life and death?" Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 505-510.
- Baltscheffsky, H. (1997). "Major "anastrophes" in the origin and early evolution of biological energy conversion." J Theor Biol **187**(4): 495-501.
- Baltscheffsky, M. (1967). "Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from Rhodospirillum rubrum." Nature **216**(5112): 241-243.
- Baltscheffsky, M., A. Schultz, et al. (1999). "H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family." FEBS Lett **452**(3): 121-127.
- Barbet, N. C., U. Schneider, et al. (1996). "TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast." Molecular Biology of the Cell **7**(1): 25-42.
- Bastow, E. L., C. W. Gourlay, et al. (2011). "Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis." Biochem Soc Trans **39**(5): 1482-1487.
- Baykob, A. A., E. B. Dubnova, et al. (1993). "Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzymes." FEBS Lett **327**: 199-202.

- Billington, R. A., A. A. Genazzani, et al. (2008). "NAD depletion by FK866 induces autophagy." Autophagy **4**(3): 385-387.
- Bornefeld, T. W., U. (1981). "Adenylate energy charge and phosphorylation potential in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*." Biochemie und Physiologie der Pflanzen v. **176** (1).
- Botstein, D. and G. R. Fink (2011). "Yeast: an experimental organism for 21st Century biology." Genetics **189**(3): 695-704.
- Bowman, E. J., A. Siebers, et al. (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 7972-7976.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bro, C., S. Knudsen, et al. (2005). "Improvement of galactose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of phosphoglucomutase: example of transcript analysis as a tool in inverse metabolic engineering." Appl Environ Microbiol **71**(11): 6465-6472.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell **89**(3): 331-340.
- Bruzzone, S., F. Fruscione, et al. (2009). "Catastrophic NAD⁺ depletion in activated T lymphocytes through Nampt inhibition reduces demyelination and disability in EAE." PloS One **4**(11): e7897-e7897.
- Carmona-Gutierrez, D., T. Eisenberg, et al. (2010). "Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines." Cell Death Differ **17**(5): 763-773.

- Carnal, N. W. and C. C. Black (1979). "Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves." Biochem Biophys Res Commun **86**(1): 20-26.
- Carroll, A. S. and E. K. O'Shea (2002). "Pho85 and signaling environmental conditions." Trends in biochemical sciences **27**(2): 87-93.
- Carystinos, G. D., H. R. MacDonald, et al. (1995). "Vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice." Plant Physiol **108**(2): 641-649
- Collins, T. J. (2007). "ImageJ for microscopy." BioTechniques **43**(1 Suppl): 25-30.
- Cook, G. A., M. T. King, et al. (1980). "Changes in liver inorganic pyrophosphate content during ethanol metabolism." Adv Exp Med Biol **132**: 433-440.
- Cooperman, B. S., A. A. Baykov, et al. (1992). "Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase." Trends Biochem Sci **17**(7): 262-266.
- Cormack, B. P., G. Bertram, et al. (1997). "Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*." Microbiology **143** (Pt 2): 303-311.
- Cowart, R. E., S. Swope, et al. (1986). "The exchange of Fe³⁺ between pyrophosphate and transferrin. Probing the nature of an intermediate complex with stopped flow kinetics, rapid multimixing, and electron paramagnetic resonance spectroscopy." J Biol Chem **261**(10): 4607-4614.
- Coyle, B., P. Kinsella, et al. (2004). "Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes." Toxicol In Vitro **18**(1): 63-70.

-
- Cyert, M. S. (2001). "Regulation of nuclear localization during signaling." J Biol Chem **276**(24): 20805-20808.
- Chanson, A., J. Fichmann, et al. (1985). "Pyrophosphate-driven proton transport by microsomal membranes of corn coleoptiles." Plant Physiol **79**(1): 159-164.
- Chen, J., A. Brevet, et al. (1990). "Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*." J Bacteriol **172**: 5686-5689.
- Chen, J., A. Brevet, et al. (1990). "Pyrophosphatase Is Essential for Growth of *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **172**(10): 5686-5689.
- Chen, J., A. Brevet, et al. (1990). "Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*." J Bacteriol **172**(10): 5686-5689.
- Choudhary, M. K., D. Basu, et al. (2009). "Dehydration-responsive nuclear proteome of rice (*Oryza sativa* L.) illustrates protein network, novel regulators of cellular adaptation, and evolutionary perspective." Mol Cell Proteomics **8**(7): 1579-1598.
- Davies, J. M., R. J. Poole, et al. (1992). "Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 11701-11705.
- De Freitas, J., H. Wintz, et al. (2003). "Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies." Biometals **16**(1): 185-197.
- De la Rosa MA, H. M., Serrano A y Losada M (1990). Fotobioquímica. Madrid.
- De Meis, L. (1984). "Pyrophosphate of high and low energy." J Biol Chem **259**: 6090-6097.

- Denton, D., S. Nicolson, et al. (2012). "Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts." Cell Death Differ **19**(1): 87-95.
- Deutscher, M. P. and A. Kornberg (1969). "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 28. The pyrophosphate exchange and pyrophosphorolysis reactions of deoxyribonucleic acid polymerase." J Biol Chem **244**(11): 3019-3028.
- Diaz-Ruiz, R., M. Rigoulet, et al. (2011). "The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression." Biochim Biophys Acta **1807**(6): 568-576.
- Diaz-Ruiz, R., S. Uribe-Carvajal, et al. (2009). "Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism." Biochimica et Biophysica Acta **1796**: 252-265.
- Dice, J. F. (1988). "Microinjected ribonuclease A as a probe for lysosomal pathways of intracellular protein degradation." J Protein Chem **7**(2): 115-127.
- Docampo, R., W. de Souza, et al. (2005). "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man." Nat Rev Microbiol **3**(3): 251-261.
- Dodds, E., M. G. Dunckley, et al. (1998). "Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER." Gene Ther **5**(4): 542-551.
- Drake, R., A. Serrano, et al. (2010). "N-terminal chimaeras with signal sequences enhance the functional expression and alter the subcellular localization of heterologous membrane-bound inorganic pyrophosphatases in yeast." Biochem J **426**(2): 147-157.
- Drozdowicz, Y. M. and P. A. Rea (2001). "Vacuolar H(+) pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream." Trends Plant Sci **6**(5): 206-211.

- Dulbecco, R. and G. Freeman (1959). "Plaque production by the polyoma virus." Virology **8**(3): 396-397.
- Edwards, J. R., T. Wilson, PM. Morell, S. (1984). "Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissues of *Pisum sativum* L." Planta **162**, 188-191.
- Fabrizio, P., S. Hoon, et al. (2010). "Genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies vacuolar protein sorting, autophagy, biosynthetic, and tRNA methylation genes involved in life span regulation." PLoS Genet **6**(7): e1001024.
- Farre, E. M., A. Bachmann, et al. (2001). "Acceleration of potato tuber sprouting by the expression of a bacterial pyrophosphatase." Nat Biotechnol **19**: 268-272.
- Fendt, S. M. and U. Sauer (2010). "Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates." BMC Syst Biol **4**: 12.
- Fischer-Schliebs, E., E. Ball, et al. (1997). "Differential immunological cross-reactions with antisera against the V-ATPase of *Kalanchoe daigremontiana* reveal structural differences of V-ATPase subunits of different plant species." Biol Chem **378**(10): 1131-1139.
- Forgac, M. (2007). "Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 917-929.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.
- Gdula, D. A., R. Sandaltzopoulos, et al. (1998). "Inorganic pyrophosphatase is a component of the *Drosophila* nucleosome remodeling factor complex." Genes Dev **12**(20): 3206-3216.

- Geigenberger, P., M. Hajirezaei, et al. (1998). "Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers." Planta **205**: 428-437.
- Giaever, G., A. M. Chu, et al. (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." Nature **418**(6896): 387-391.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-138.
- Gomez-Garcia, M. R., M. Losada, et al. (2006). "A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes." Biochem J **395**(1): 211-221.
- Gómez-García, M. R., M. Losada, et al. (2006). "A Novel Subfamily of Monomeric Inorganic Pyrophosphatases in Photosynthetic Eukaryotes." Biochem J **395**: 211-221.
- Gomez-Garcia, M. R., L. M. Ruiz-Perez, et al. (2004). "A novel calcium-dependent soluble inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*." FEBS Lett **560**(1-3): 158-166.
- Gomez-Garcia, M. R. and A. Serrano (2002). "Expression studies of two paralogous ppa genes encoding distinct Family I pyrophosphatases in marine unicellular cyanobacteria reveal inactivation of the typical cyanobacterial gene." Biochem Biophys Res Commun **295**(4): 890-897.

- Gomez Garcia, E. B., S. R. Poort, et al. (2001). "Two novel and one recurrent missense mutation in the factor XIII A gene in two Dutch patients with factor XIII deficiency." Br J Haematol **112**(2): 513-518.
- Greenwood, M. T. and P. Ludovico (2010). "Expressing and functional analysis of mammalian apoptotic regulators in yeast." Cell Death Differ **17**(5): 737-745.
- Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." Genes Dev **14**(9): 1021-1026.
- Hakki, S. and A. Sitaramayya (1990). "Guanylate cyclase from bovine rod outer segments: solubilization, partial purification, and regulation by inorganic pyrophosphate." Biochemistry **29**(4): 1088-1094.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- He, C. and D. J. Klionsky (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." Annu Rev Genet **43**: 67-93.
- Hegemann, J. H., S. Klein, et al. (1999). "A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in Saccharomyces cerevisiae strains." Yeast **15**(10B): 1009-1019.
- Heinonen, J. K. (2001). Biological Role of Inorganic Pyrophosphate. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Henry, S. A. and J. L. Patton-Vogt (1998). "Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **61**: 133-179.
- Hernández, A., G. López-Lluch, et al. (2009). "HDAC and Hsp90 inhibitors down-regulate PTTG1/securin but do not induce aneuploidy." Genes, chromosomes & cancer **48**(2): 194-201.

- Hill, J. E., D. A. Scott, et al. (2000). "Cloning and functional expression of a gene encoding a vacuolar-type proton-translocating pyrophosphatase from *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **351**(Pt 1): 281-288.
- Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." Gene **57**(2-3): 267-272.
- Holen, I. and R. E. Coleman (2010). "Anti-tumour activity of bisphosphonates in preclinical models of breast cancer." Breast Cancer Research: BCR **12**(6): 214-214.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-1583.
- Ivanchuk, S. M. and J. T. Rutka (2004). "The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints." Neurosurgery **54**(3): 692-699; discussion 699-700.
- Jault, J. M., S. R. Paik, et al. (1994). "Lowered temperature or binding of pyrophosphate to sites for noncatalytic nucleotides modulates the ATPase activity of the beef heart mitochondrial F1-ATPase by decreasing the affinity of a catalytic site for inhibitory MgADP." Biochemistry **33**(50): 14979-14985.
- Jimenez-Hidalgo, M., C. Santos-Ocana, et al. (2009). "NQR1 controls lifespan by regulating the promotion of respiratory metabolism in yeast." Aging cell **8**(2): 140-151.
- Jonkers, W. and M. Rep (2009). "Lessons from fungal F-box proteins." Eukaryot Cell **8**(5): 677-695.
- Journo, D., G. Winter, et al. (2008). "Monitoring autophagy in yeast using FM 4-64 fluorescence." Methods in enzymology **451**: 79-88.

- Kalashnikova, T., Y. M. Milgrom, et al. (1988). "The effect of inorganic pyrophosphate on the activity and Pi-binding properties of mitochondrial F1-ATPase." Eur J Biochem **177**(1): 213-218.
- Karlsson, J. (1975). "Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L)." Biochim Biophys Acta **399**(2): 356-363.
- Kasho, V. N. and S. M. Avaeva (1978). "Isolation of the inorganic pyrophosphatase from brewer's yeast and studies on the localization of this enzyme in brewer's and baker's yeast." Int J Biochem **9**(1): 51-56.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Khandelwal, R. L. (1978). "The regulation of liver phosphoprotein phosphatase by inorganic pyrophosphate and cobalt." Arch Biochem Biophys **191**(2): 764-773.
- Khurana, V. and S. Lindquist (2010). "Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast?" Nat Rev Neurosci **11**(6): 436-449.
- Kim, E. J., R. G. Zhen, et al. (1994). "Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 6128-6132.
- Kim, J., W. P. Huang, et al. (2001). "Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex." The Journal of Cell Biology **152**(1): 51-64.
- Kirkland, J. B. (2010). "Poly ADP-ribose polymerase-1 and health." Exp Biol Med **235**(5): 561-568.

- Klemme, J. H. (1976). "Regulation of intracellular pyrophosphatase-activity and conservation of the phosphoanhydride-energy of inorganic pyrophosphate in microbial metabolism." Z Naturforsch C **31**(9-10): 544-550.
- Kolakowski, L. F., Jr., G. P. O'Neill, et al. (1998). "Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3." J Neurochem **71**(6): 2239-2251.
- Konstantinova, I. M., A. S. Tsimokha, et al. (2008). "Role of proteasomes in cellular regulation." Int Rev Cell Mol Biol **267**: 59-124.
- Kornberg, A. (1948). "The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide." J Biol Chem **176**: 1475-1476.
- Kornberg, S. R. (1957). "Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **26**(2): 294-300.
- Kukko-Kalske, E. and J. Heinonen (1985). "Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase in *Escherichia coli*." Int J Biochem **17**: 575-580.
- Kukko-Kalske, E. and J. Heinonen (1985). "Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase in *Escherichia coli*." Int J Biochem **17**(5): 575-580.
- Kukko-Kalske, E., M. Lintunen, et al. (1989). "Intracellular PP_i concentration is not directly dependent on amount of inorganic pyrophosphatase in *Escherichia coli* K-12 cells." J Bacteriol **171**(8): 4498-4500.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

- Lahti, R., T. Pitkaranta, et al. (1988). "Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **170**(12): 5901-5907.
- Lahti, R., T. Pitkäranta, et al. (1988). "Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **170**: 5901-5907.
- Lecker, S. H., A. L. Goldberg, et al. (2006). "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." J Am Soc Nephrol **17**(7): 1807-1819.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 589-598.
- Lemontt, J. F. (1971). "Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light." Genetics **68**(1): 21-33.
- Lichko, L. and L. Okorokov (1991). "Purification and some properties of membrane-bound and soluble pyrophosphatases of yeast vacuoles." Yeast **7**(8): 805-812.
- Lichko, L. P., T. V. Kulakovskaya, et al. (1997). "Detection and some properties of membrane-bound and soluble polyphosphatases in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochemistry (Mosc) **62**(10): 1146-1151.
- Lichko, L. P., T. V. Kulakovskaya, et al. (2003). "Nuclear exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is not encoded by the PPX1 gene encoding the major yeast exopolyphosphatase." FEMS Yeast Res **3**(1): 113-117.
- Lin, S.-J., E. Ford, et al. (2004). "Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH." Genes & Development **18**(1): 12-16.

- Lin, S.-J., M. Kaeberlein, et al. (2002). "Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration." Nature **418**(6895): 344-348.
- Loewith, R. and M. N. Hall (2011). "Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control." Genetics **189**(4): 1177-1201.
- Losada, M., M. A. Vargas, et al. (1999). Los elementos y moléculas de la vida. Madrid.
- Losada M, V. M., de la Rosa MA y Florencio FJ (1999). Los elementos y moléculas de la vida. Madrid.
- Lotito, L., A. Russo, et al. (2009). "A specific transcriptional response of yeast cells to camptothecin dependent on the Swi4 and Mbp1 factors." Eur J Pharmacol **603**(1-3): 29-36.
- Lu, S.-P. and S.-J. Lin (2010). "Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction." Biochimica Et Biophysica Acta **1804**(8): 1567-1575.
- Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg (1999). "Control of the cell cycle and apoptosis." Eur J Cancer **35**(14): 1886-1894.
- Lundin, M., H. Baltscheffsky, et al. (1991). "Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function." J Biol Chem **266**(19): 12168-12172.
- Lundin, M., S. W. Deopujari, et al. (1992). "Characterization of a mitochondrial inorganic pyrophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1098**: 217-223.
- Lundin, M., S. W. Deopujari, et al. (1992). "Characterization of a mitochondrial inorganic pyrophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1098**(2): 217-223.

- Lundinsb, M., H. Baltscheffskys, et al. (1991). "Yeast PPA2 Gene Encodes a Mitochondrial Inorganic Pyrophosphatase That Is Essential for Mitochondrial Function*." Journal of Biological Chemistry **266**(19): 12168-12172.
- Luo, X., N. Talarek, et al. (2011). "Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs." RNA Biol **8**(1): 14-17.
- Luther-Wyrsh, A., E. Costello, et al. (2001). "Stable transduction with lentiviral vectors and amplification of immature hematopoietic progenitors from cord blood of preterm human fetuses." Hum Gene Ther **12**(4): 377-389.
- Madeo, F., E. Frohlich, et al. (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." J Cell Biol **139**(3): 729-734.
- Madeo, F., E. Frohlich, et al. (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." The Journal of Cell Biology **139**(3): 729-734.
- Madeo, F., E. Frohlich, et al. (1999). "Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast." J Cell Biol **145**(4): 757-767.
- Maeshima, M. (1991). "H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca²⁺, stabilization by Mg²⁺ and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases." Eur J Biochem **196**(1): 11-17.
- Maeshima, M. (2000). "Vacuolar H(+)-pyrophosphatase." Biochim Biophys Acta **1465**(1-2): 37-51.
- Maeshima, M. and S. Yoshida (1989). "Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean." J Biol Chem **264**(33): 20068-20073.

- Manon, S., B. Chaudhuri, et al. (1997). "Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL." FEBS Lett **415**(1): 29-32.
- Marquardt-Jarczyk, G. L., U. (1990). "PP_iase-activated ATP-dependent H⁺ transport at the tonoplast of mesophyll cells of the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana*." Botanica acta **103**: 203-213.
- McIntosh, M. T. and A. B. Vaidya (2002). "Vacuolar type H⁺ pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa." Int J Parasitol **32**(1): 1-14.
- Merckel, M. C., I. P. Fabrichniy, et al. (2001). "Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism." Structure **9**(4): 289-297.
- Mitsuda, N., K. Enami, et al. (2001). "Novel type *Arabidopsis thaliana* H(+)-PPase is localized to the Golgi apparatus." FEBS Lett **488**(1-2): 29-33.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Morgan, G. and A. Lipton (2010). "Antitumor effects and anticancer applications of bisphosphonates." Seminars in Oncology **37 Suppl 2**: S30-40-S30-40.
- Moser, B. A. and P. Russell (2000). "Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*." Curr Opin Microbiol **3**(6): 631-636.
- Motta, L. S., W. S. da Silva, et al. (2004). "A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate." Insect Biochem Mol Biol **34**(1): 19-27.
- Nakamura, N., A. Matsuura, et al. (1997). "Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biochemistry **121**(2): 338-344.

- Nakanishi, Y., N. Matsuda, et al. (1999). "Molecular cloning and sequencing of the cDNA for vacuolar H⁺-pyrophosphatase from *Chara corallina*1." Biochim Biophys Acta **1418**(1): 245-250.
- Nyren, P., B. F. Nore, et al. (1991). "Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution." Biochemistry **30**(11): 2883-2887.
- O'Sullivan, W. J. and G. W. Smithers (1979). "Stability constants for biologically important metal-ligand complexes." Methods Enzymol **63**: 294-336.
- Orrenius, S., P. Nicotera, et al. (2011). "Cell death mechanisms and their implications in toxicology." Toxicol Sci **119**(1): 3-19.
- Osborn, M. J. and J. R. Miller (2007). "Rescuing yeast mutants with human genes." Brief Funct Genomic Proteomic **6**(2): 104-111.
- Pereira, C., I. Coutinho, et al. (2012). "New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model." FEBS J **279**(5): 697-712.
- Perez-Castineira, J. R., J. Alvar, et al. (2002). "Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa." Biochem Biophys Res Commun **294**(3): 567-573.
- Perez-Castineira, J. R., R. Gomez-Garcia, et al. (2001). "Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones?" Int Microbiol **4**(3): 135-142.
- Perez-Castineira, J. R., A. Hernandez, et al. (2011). "A plant proton-pumping inorganic pyrophosphatase functionally complements the vacuolar ATPase transport

- activity and confers bafilomycin resistance in yeast." Biochem J **437**(2): 269-278.
- Perez-Castineira, J. R., R. L. Lopez-Marques, et al. (2001). "A thermostable K(+)-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." FEBS Lett **496**(1): 6-11.
- Perez-Castineira, J. R., R. L. Lopez-Marques, et al. (2002). "Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H⁺-translocating pyrophosphatases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(25): 15914-15919.
- Perez-Castineira, J. R., R. L. Lopez-Marques, et al. (2002). "Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H⁺-translocating pyrophosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15914-15919.
- Pérez-Castiñeira, J. R., R. Gómez-García, et al. (2001). "Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones?" Int Microbiol **4**: 135-142.
- Pérez-Castiñeira, J. R., R. L. López-Marqués, et al. (2001). "A thermostable K⁺-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." FEBS Lett **496**: 6-11.
- Perrotte-Piquemal, M., A. Danchin, et al. (1999). "Pyrophosphate increases the efficiency of enterobactin-dependent iron uptake in *Escherichia coli*." Biochimie **81**(3): 245-253.
- Portt, L., G. Norman, et al. (2011). "Anti-apoptosis and cell survival: a review." Biochim Biophys Acta **1813**(1): 238-259.

- Postma, E., C. Verduyn, et al. (1989). "Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*." Appl Environ Microbiol **55**(2): 468-477.
- Preiss, J. and E. Greenberg (1983). "Pyrophosphate may be involved in regulation of bacterial glycogen synthesis." Biochem Biophys Res Commun **115**(3): 820-826.
- Proskuryakov, S. Y., V. L. Gabai, et al. (2002). "Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death." Biochemistry (Mosc) **67**(4): 387-408.
- Rao, N. N., M. F. Roberts, et al. (1985). "Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions." J Bacteriol **162**(1): 242-247.
- Rea, P. A., C. J. Britten, et al. (1992). "Regulation of vacuolar h-pyrophosphatase by free calcium : a reaction kinetic analysis." Plant Physiol **100**(4): 1706-1715.
- Rea, P. A. and R. J. Poole (1985). "Proton-Translocating Inorganic Pyrophosphatase in Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Tonoplast Vesicles." Plant Physiol **77**(1): 46-52.
- Rea, P. A. and R. J. Poole (1993). "Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **44**: 157-180.
- Rea, P. a. P., RJ. (1993). "Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **44**, **157-180**.
- Reddy, V. S., G. S. Ali, et al. (2002). "Genes encoding calmodulin-binding proteins in the Arabidopsis genome." J Biol Chem **277**(12): 9840-9852.
- Reeves, R. (1976). "How useful is the energy in inorganic pyrophosphate?" Trends Biochem Sci **53-55**.
- Rogers, M. J., S. Gordon, et al. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates." Cancer **88**(12 Suppl): 2961-2978.

- Rojas-Beltrán, J. A., F. Dubois, et al. (1999). "Identification of cytosolic Mg^{2+} -dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis." Plant Mol Biol **39**: 449-461.
- Ruckenstuhl, C., D. Carmona-Gutierrez, et al. (2010). "The sweet taste of death: glucose triggers apoptosis during yeast chronological aging." Aging (Albany NY) **2**(10): 643-649.
- Salminen, A., A. N. Parfenyev, et al. (2002). "Modulation of dimer stability in yeast pyrophosphatase by mutations at the subunit interface and ligand binding to the active site." J Biol Chem **277**(18): 15465-15471.
- Salminen, T., J. Kapyła, et al. (1995). "Structure and function analysis of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase: is a hydroxide ion the key to catalysis?" Biochemistry **34**(3): 782-791.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory Manual. New York.
- Samygina, V. R., A. N. Popov, et al. (2001). "The structures of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase complexed with Ca^{2+} or $CaPP(i)$ at atomic resolution and their mechanistic implications." J Mol Biol **314**(3): 633-645.
- Santos, A. X. and H. Riezman (2012). "Yeast as a model system for studying lipid homeostasis and function." FEBS Lett **586**(18): 2858-2867.

- Sarafian, V., Y. Kim, et al. (1992). "Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1775-1779.
- Sazer, S. and S. W. Sherwood (1990). "Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast." Journal of cell science **97** (Pt 3): 509-516.
- Schneider, J. C. and L. Guarente (1991). "Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction." Methods Enzymol **194**: 373-388.
- Schuller, H. J. (2003). "Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **43**(3): 139-160.
- Schumacher, K. (2006). "Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport." Curr Opin Plant Biol **9**(6): 595-600.
- Serrano, A., J. R. Perez-Castineira, et al. (2007). "H⁺-PPases: yesterday, today and tomorrow." IUBMB Life **59**(2): 76-83.
- Serrano, R. and J. M. Villalba (1995). "Expression and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*." Methods Cell Biol **50**: 481-496.
- Sherman, F. (1991). "Getting started with yeast." Methods Enzymol **194**: 3-21.
- Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1985). "Methods in Yeast Genetics." Cold Spring Harb Symp Quant Biol: 90-93.
- Shintani, T., T. Uchiumi, et al. (1998). "Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes." FEBS Lett **439**(3): 263-266.

- Silva, R. D., S. Manon, et al. (2011). "The importance of humanized yeast to better understand the role of bcl-2 family in apoptosis: finding of novel therapeutic opportunities." Curr Pharm Des **17**(3): 246-255.
- Sivula, T., A. Salminen, et al. (1999). "Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase." FEBS Lett **454**: 75-80.
- Smart, L. B., F. Vojdani, et al. (1998). "Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated." Plant Physiol **116**(4): 1539-1549.
- Smyth, D. A. and C. C. Black (1984). "Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues." Plant Physiol **75**(3): 862-864.
- Sonnewald, U. (2001). "Control of potato tuber sprouting." Trends Plant Sci **6**: 333-335.
- Starita, L. M., R. S. Lo, et al. (2012). "Sites of ubiquitin attachment in *Saccharomyces cerevisiae*." Proteomics **12**(2): 236-240.
- Stitt, M. (1998). "Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP." Bot Acta **111**: 167-175.
- Sutterlin, C., M. V. Escribano, et al. (1998). "Saccharomyces cerevisiae GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis." Biochem J **332** (Pt 1): 153-159.
- Suzuki, Y., Y. Kanayama, et al. (1999). "Vacuolar H(+)-pyrophosphatase purified from pear fruit." Phytochemistry **50**(4): 535-539.
- Swanson, S. J. and R. L. Jones (1996). "Gibberellic Acid Induces Vacuolar Acidification in Barley Aleurone." Plant Cell **8**(12): 2211-2221.

- Takahashi, R., S. Nakamura, et al. (2010). "Structure and reaction mechanism of human nicotinamide phosphoribosyltransferase." Journal of Biochemistry **147**(1): 95-107.
- Tanaka, K. (2009). "The proteasome: overview of structure and functions." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**(1): 12-36.
- Teixeira, D. and R. Parker (2007). "Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **18**(6): 2274-2287.
- Terkeltaub, R. A. (2001). "Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology." Am J Physiol. Cell Physiol **281**(1): C1-C11.
- Terrier, N., F. X. Sauvage, et al. (2001). "Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development." Planta **213**(1): 20-28.
- Terrier, N. D., C. Sauvage F. Martinoia, E. Romieu, C. (1998). "Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast." plant physiol biochem **36**, 367-377.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Upton, R. H., R. P. Haugland, et al. (1996). "A spectrophotometric method to measure enzymatic activity in reactions that generate inorganic pyrophosphate." Anal Biochem **243**(1): 41-45.
- Vaisman, A., H. Ling, et al. (2005). "Fidelity of Dpo4: effect of metal ions, nucleotide selection and pyrophosphorolysis." EMBO J **24**(17): 2957-2967.

- Verstrepen, K. J., D. Iserentant, et al. (2004). "Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?" Trends in Biotechnology **22**(10): 531-537.
- Vicencio, J. M., L. Galluzzi, et al. (2008). "Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review." Gerontology **54**(2): 92-99.
- Villalba, J. M., M. G. Palmgren, et al. (1992). "Functional expression of plant plasma membrane H(+)-ATPase in yeast endoplasmic reticulum." J Biol Chem **267**(17): 12341-12349.
- Wang, B., U. Luttge, et al. (2001). "Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*." J Exp Bot **52**(365): 2355-2365.
- Warburg, F. (1959). An occupation for gentlemen. London,, Hutchinson.
- Weiner, H. (1987). "Subcellular localization of acetaldehyde oxidation in liver." Ann N Y Acad Sci **492**: 25-34.
- Weiner, H. S., M Heldt, HW (1987). "Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves." Biochim Biophys Acta **893**, 13-21.
- Weinlich, R., C. P. Dillon, et al. (2011). "Ripped to death." Trends Cell Biol **21**(11): 630-637.
- West, T. P. (1985). "Effect of pyrophosphate and orotidine monophosphate on cytosine deaminase regulatory properties." Experientia **41**(12): 1563-1564.
- Wu, W., P. Liu, et al. (2012). "Necroptosis: an emerging form of programmed cell death." Crit Rev Oncol Hematol **82**(3): 249-258.

- Xia, L., L. Jaafar, et al. (2007). "Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae*." Cancer Res **67**(23): 11411-11418.
- Yang, Z. and T. G. Wensel (1992). "Inorganic pyrophosphatase from bovine retinal rod outer segments." J Biol Chem **267**(34): 24634-24640.
- Yang, Z. and T. G. Wensel (1992). "Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a mammalian inorganic pyrophosphatase." J Biol Chem **267**(34): 24641-24647.
- Young, T. W., N. J. Kuhn, et al. (1998). "Bacillus subtilis ORF yybQ encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase?" Microbiology **144** (Pt 9): 2563-2571.
- Yu, T. S., T.; Omata, S. (1976). "Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*." Agricultural and Biological Chemistry v. **40**(3) (0002-1369): 543-549.
- Zhang, Z. and J. C. Reese (2006). "Isolation of yeast nuclei and micrococcal nuclease mapping of nucleosome positioning." Methods Mol Biol **313**: 245-255.
- Ziegler, M. and S. L. Oei (2001). "A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription." BioEssays **23**(6): 543-548.
- Ziv, I., Y. Matiuhin, et al. (2011). "A perturbed ubiquitin landscape distinguishes between ubiquitin in trafficking and in proteolysis." Mol Cell Proteomics **10**(5): M111 009753.
- Zivny, J., P. Klener, Jr., et al. (2010). "The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies." Curr Pharm Des **16**(1): 11-33.

Zyryanov, A. B., A. S. Shestakov, et al. (2002). "Mechanism by which metal cofactors control substrate specificity in pyrophosphatase." Biochem J **367**(Pt 3): 901-906.

Zyryanov, A. B., M. Tammenkoski, et al. (2004). "Site-specific effects of zinc on the activity of family II pyrophosphatase." Biochemistry **43**(45): 14395-14402.

