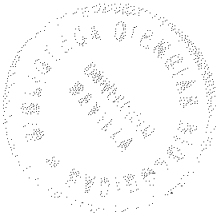


R. 20.579

TS 450



FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES  
Y AGROBIOLOGIA

CSIC UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al  
folio... 132... número... 234... del libro  
correspondiente.

Sevilla, 22 MAYO 2001

El Jefe del Negociado

*Álvaro Kapfeller*

REGULACION DE LA HOMEOSTASIS DE SODIO Y POTASIO  
POR LA PROTEINA FOSFATASA CALCINEURINA

Imelda Mendoza Baisas

TESIS DOCTORAL

# REGULACION DE LA HOMEOSTASIS DE SODIO Y POTASIO POR LA PROTEINA FOSFATASA CALCINEURINA

Tesis presentada por la licenciada Imelda Mendoza Baisas  
para optar al grado de Doctor en Biología

El Director



Fdo. Dr. José Manuel Pardo Prieto  
Científico Titular  
CSIC

El Doctorando



Fdo. Imelda Mendoza Baisas

## INDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. La salinización de los suelos como problema agrícola.....	1
1.2. Efecto sobre las plantas del exceso de sal.....	2
1.3. Obtención de plantas tolerantes a sal.....	4
1.4. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema modelo.....	4
1.5. Respuesta de la levadura <i>S. cerevisiae</i> al estrés osmótico. Ruta HOG.....	5
1.6. Homeostasis de iones en <i>S. cerevisiae</i> .....	7
1.7. Homeostasis de iones en plantas.....	10
1.8. Calcineurina.....	11
1.9. Factores de transcripción.....	15
1.10. Regulación transcripcional por estrés.....	16

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.....	17
2.1.1. Productos químicos y bioquímicos.....	17
2.1.2. Material biológico.....	17
2.2. Métodos.....	17
2.2.1. Medios y condiciones de crecimiento.....	21
2.2.1.1. Bacterias.....	21
2.2.1.2. Levaduras.....	21
2.2.2. Técnicas de análisis genético.....	22
2.2.2.1. Construcción de diploides.....	22
2.2.2.2. Esporulación y análisis de esporas.....	23
2.2.2.3. Construcción de estirpes isogénicas de talos opuestos.....	23
2.2.3. Técnicas generales de manipulación de Ácidos nucleicos.....	24
2.2.3.1. Aislamiento de plásmidos.....	24
2.2.3.2. Preparación de DNA cromosómico de levaduras.....	25
2.2.3.3. Preparación de RNA de levadura.....	25
2.2.3.4. Tratamientos enzimáticos del DNA.....	25
2.2.3.5. Clonaje de fragmentos de DNA.....	25
2.2.3.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	27
2.2.3.7. Purificación de DNA de geles de agarosa.....	27
2.2.3.8. Hibridación de ácidos nucleicos.....	28
2.2.3.9. Amplificación por PCR de fragmentos de DNA.....	28
2.2.4. Transformación de células.....	29
2.2.4.1. Transformación de <i>E. coli</i> . ....	29
2.2.4.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	29
2.2.5. Mutagenesis de levadura con EMS.....	30
2.2.6. Determinación de la tolerancia a inhibidores del crecimiento.....	30
2.2.6.1. Ensayos en cultivos líquidos.....	30
2.2.6.2. Ensayos en medios sólidos.....	31
2.2.7. Ensayos de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	31
2.2.8. Cinética de acumulación de cationes en células de <i>S. cerevisiae</i> .....	33
2.2.9. Métodos de Fluorescencia microscópica.....	33
2.2.9.1. Tinción de la quitina de la pared celular.....	33
2.2.9.2. Tinción del núcleo.....	33

## 3. RESULTADOS.

3.1. Aislamiento de mutantes de levadura sensibles a NaCl.....	34
3.1.1. Análisis genético de los mutantes SS.....	34
3.1.2. Estudio del mutante SS2.....	36
3.2. Aislamiento del gen <i>CNBI</i> .....	40

3.2.1.	La proteína fosfatasa calcineurina es esencial para la tolerancia a NaCl.....	44
3.2.2.	Calcineurina regula la homeostasis de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	48
3.2.2.1.	Regulación del gen <i>ENAI</i> por calcineurina.....	48
3.2.2.2.	Calcineurina es necesaria para el transporte de K <sup>+</sup> de alta afinidad en presencia de NaCl.....	54
3.3.	Activación de calcineurina <i>in vivo</i> .....	57
3.3.1.	Obtención de una calcineurina con actividad constitutiva <i>in vivo</i> .....	57
3.3.1.1.	Sobreexpresión de la subunidad catalítica.....	57
3.3.1.2.	Sobreexpresión de la subunidad catalítica y reguladora.....	58
3.3.2.	Incremento en la tolerancia a Na <sup>+</sup> y Li <sup>+</sup> por sobreactivación de calcineurina.....	62
3.3.3.	Efecto de la activación constitutiva de calcineurina sobre la homeostasis de iones.....	66
3.3.3.1.	Incremento en la expresión del gen <i>ENAI</i> .....	66
3.3.3.2.	Efecto sobre Trk1.....	66
3.3.4.	La activación constitutiva de calcineurina altera el patrón de gemación y la morfología celular.....	72
3.4.	Estudio del mutante SS10.....	85
3.4.1.	Análisis de segregación de la mutación <i>nls2</i> .....	85
3.4.2.	Complementación del mutante <i>nls2</i> . Aislamiento del gen <i>YAP4</i> .....	87
3.4.3.	<i>YAP4</i> es un supresor de la mutación <i>nls2</i> .....	89
3.5.	<i>Yap4</i> es un factor de transcripción de la familia bZip.....	92
3.6.	<i>Yap4</i> es un supresor de la mutación en calcineurina.....	92
3.6.1.	<i>Yap4</i> transactiva la expresión del gen <i>ENAI</i> .....	96
3.6.2.	<i>Yap4</i> interviene en la homeostasis de Mn <sup>2+</sup> .....	100
3.6.3.	<i>Yap4</i> transactiva <i>ENAI</i> por un mecanismo dependiente de la ruta calcineurina. Su función es independiente de <i>Tcn1/Crz1</i> .....	100
3.6.4.	<i>Yap4</i> transactiva <i>ENAI</i> de manera independiente de la ruta HOG.....	103
3.7.	El gen <i>YDR259/CAD32</i> , homólogo a <i>YAP4</i> es esencial para la tolerancia a Cd <sup>2+</sup> ....	108
4.	<b>DISCUSION.</b>	
4.1	Identificación de la proteína fosfatasa calcineurina.....	117
4.2.	Regulación de la actividad Na <sup>+</sup> -ATPasa dependiente de <i>Ena1</i> .....	118
4.2.1.	Regulación de la expresión de <i>ENAI</i> .....	118
4.2.1.1.	Represión por glucosa.....	118
4.2.1.2.	Regulación de la expresión de <i>ENAI</i> por estrés salino.....	119
4.2.1.2.1.	Regulación osmótica dependiente de HOG.....	119
4.2.1.2.2.	Regulación iónica dependiente de calcineurina.....	120
4.2.1.3.	Otros reguladores transcripcionales de <i>ENAI</i> .....	120
4.2.2.	Regulación post-traducciona1 de <i>Ena1</i> .....	121
4.3.	Regulación de la toma de K <sup>+</sup> dependiente de Trk1 y Trk2.....	121
4.4.	Señalización y regulación de Ca <sup>2+</sup> dependiente de calcineurina.....	123
4.5.	Sobreactivación de calcineurina.....	125
4.5.1.	Efecto de la sobreactivación de calcineurina sobre el transporte de iones....	126
4.5.2.	Efecto de la sobreactivación de calcineurina sobre la morfología celular...	128
4.6.	Factor de transcripción <i>Yap4</i> .....	129
4.7.	Factor de transcripción <i>Cad3</i> .....	131
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	132
6.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	133



## 1. INTRODUCCION

### 1.1. La salinización de los suelos como problema agrícola.

La salinización de los suelos cultivables es uno de los principales problemas en la agricultura a nivel mundial. Las regiones áridas tienen en muchos casos unas condiciones de luz y temperatura muy adecuadas para el crecimiento de plantas, pero la falta de precipitaciones se debe compensar con riego. A diferencia del agua de lluvia, el agua subterránea o la proveniente de ríos y embalses lleva disueltas sales en mayor o menor proporción, que se van acumulando sobre el suelo cuando se evapora el agua. Este agua contiene fundamentalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . A medida que el agua se evapora, los dos primeros tienden a precipitar como carbonatos, dejando al  $\text{Na}^+$  como catión dominante. Tras décadas de regadío el suelo se deteriora, haciéndose incompatible con una alta productividad de los cultivos (Serrano, 1996). Según la FAO, la salinización ya ha dañado 30 millones de hectáreas de los 240 millones de hectáreas de terrenos irrigados en el mundo. En China, por ejemplo, la salinización ha frenado la cosecha en casi un cuarto de los terrenos de cultivo del país (Revista 'Time', 23-3-98). Una solución al problema agrícola ocasionado por la salinización del suelo es el uso de agua de mejor calidad para el riego, importándola de otros lugares o por desalinización del agua disponible, regenerando los suelos salinizados. Así por ejemplo, en la comarca de Lebrija (Sevilla), se ha instalado un mecanismo de desalinización que cubre un área de 12.5 hectáreas. Consiste en un sistema de drenaje construido con cilindros de cerámica de 30 cm, formando tubos de 250 m de longitud enterrados a una profundidad de  $\approx 1$  m y espaciados a intervalos de 10 m. Estos tubos descargan en un canal colector perpendicular a ellos. El riego continuado con agua de baja mineralización traída mediante una canalización y el drenaje posterior sirve para el lavado paulatino del suelo. Mediciones del contenido de sal después de 10 años de irrigación demostraron una reducción de 61% de  $\text{Na}^+$  en la capa superficial (0-30 cm). De esta manera se ha conseguido disminuir el contenido de  $\text{Na}^+$  a niveles que permiten el cultivo de plantas moderadamente tolerantes a la salinidad como el algodón o la remolacha (Moreno *et al.*, 1994).

Otra aproximación al problema de la salinidad es la obtención de variedades de plantas de cultivo más resistentes a condiciones salinas. En relación a la sal, el nivel de tolerancia de las plantas puede ser muy variable. Las plantas halofitas pueden tolerar hasta 500 mM NaCl, la concentración en el agua marina, mientras que el nivel de tolerancia de las glicofitas es bastante menor, de 50-100 mM (Downton, 1984). La mayor parte de las plantas de interés agrícola pertenecen a esta última categoría. Hay que tener en cuenta que la prioridad en la selección de plantas cultivables ha sido una mayor producción, tamaño de frutos o semillas, etc. Se les ha proporcionado protección y unas condiciones óptimas de crecimiento. Tras

siglos de domesticación muy posiblemente estas plantas han reducido su capacidad natural de tolerar condiciones adversas (Serrano y Gaxiola, 1994).

Aplicando técnicas de selección basadas en genética clásica se podría, en principio, obtener variedades más tolerantes. Se trataría de cruzar plantas de cultivo con sus parientes silvestres más tolerantes y realizar varios retrocruzamientos hasta conseguir una variedad que combine las características de interés agronómico con una mayor tolerancia a sal. Sin embargo, esta aproximación puede ser bastante complicada, ya que determinados caracteres son multigénicos, resultando de un efecto combinado de varios genes (Dvorak *et al.*, 1988), algo difícil de controlar con métodos tradicionales. Por otro lado, no todas las especies cultivadas tienen un pariente tolerante a sal con el que se puedan cruzar. Estos problemas se podrían solucionar con técnicas actualmente disponibles en biología molecular, que permiten una rápida transferencia de genes de un organismo a otro sin que existan barreras interespecíficas (Serrano y Gaxiola 1994).

## 1.2. Efecto del exceso de sal sobre las plantas.

A diferencia de los animales, las plantas son organismos sésiles que no pueden escapar cuando las condiciones del medio se vuelven adversas. Deben adaptarse rápidamente a las fluctuaciones ambientales para sobrevivir. Una planta que crece sobre suelos con exceso de sal se ve afectada por la combinación de dos componentes adversos, osmótico e iónico. Por un lado la presencia de sal disminuye el potencial hídrico del suelo, haciendo más difícil para la planta la absorción de agua. El resultado es un estrés hídrico similar al producido en condiciones de desecación. Por otro lado, la captación de ciertas sales a elevadas concentraciones tiene efectos tóxicos para la planta.

El agua es indispensable para el funcionamiento normal de una planta al igual que cualquier otro organismo vivo. A nivel celular, el agua funciona como solvente o embebe moléculas hidrofílicas. También determina la estructura de membranas, orientando moléculas protoplásmicas en polos hidrofílicos e hidrofóbicos. Debido a sus propiedades como disolvente, es el medio donde tiene lugar reacciones bioquímicas, actuando también como reactivo en procesos como la fotosíntesis. A nivel de tejido, el agua es el nexo de unión entre células, fluye libremente de una célula a otra a través de las paredes, constituyendo el apoplasto. A nivel de la planta completa, el agua fluye de la raíz a las hojas y se transpira a través de los estomas. Este flujo es el que sirve de conductor de nutrientes y hormonas como ABA. Por otro lado, el agua contenida en las células determina la turgencia, y con ella la forma y tamaño de la célula y la planta en su totalidad (Hohmann, 1997).

Cuando el agua contiene concentraciones elevadas de sales se altera el equilibrio necesario para el normal funcionamiento de la planta. Las células vegetales, al igual que las restantes células eucarióticas y procarióticas (a excepción de bacterias halófitas), basan su actividad en unas condiciones muy específicas en el citoplasma, en las cuales el potasio juega un papel esencial como catión preferente. La mayor parte de los enzimas intracelulares están especializados en funcionar en condiciones de bajo  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , pH neutro y alta concentración de iones  $\text{K}^+$ . Así se ha visto que por ejemplo la síntesis de proteínas ribosómicas y varios enzimas del metabolismo de carbohidratos como piruvato kinasa o fosfofructokinasa se activan por  $\text{K}^+$  e inhiben por  $\text{Na}^+$ . En cuanto al  $\text{Cl}^-$ , resulta muy tóxico para los ribosomas y afecta la fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  (Wyn Jones and Pollard, 1983)

En el caso de las plantas no está claro cuál de los dos componentes adversos, osmótico o iónico, causado por un exceso de sal en el suelo tiene un efecto predominante. Sí parece claro que la reducción en el crecimiento se debe en primer lugar a estrés hídrico y está regulado por señales inhibitorias desde la raíz a las hojas, mientras que la acumulación paulatina de iones en los tejidos vegetales sería responsable de la intoxicación de la planta a largo plazo (Munns, 1993). Las células de plantas sometidas a estrés osmótico no siempre aparecen deshidratadas, a menos que las condiciones sean muy drásticas. Las plantas tratan de mantener el contenido de agua mediante mecanismos que reducen la transpiración, como cierre de estomas, disminución del crecimiento de las hojas o senescencia; o bien aumentando el aporte de agua, por ejemplo manteniendo el crecimiento de las raíces o un aumento en la proporción de raíces respecto de tallos (Tardieu, 1996). A nivel celular, las plantas, al igual que otros organismos que incluyen bacterias, levaduras, algas marinas, plantas superiores y animales, se defienden mediante la acumulación de solutos compatibles. El papel de estos solutos es doble: ajuste osmótico y osmoprotección. Por un lado actúan como osmolitos, facilitando la retención de agua en el citoplasma, permitiendo que el  $\text{Na}^+$  se acumule en la vacuola o apoplasto. Por otro, actúan como protectores de estructuras celulares por la interacción con membranas, complejos proteicos o enzimas (Bohnert *et al.*, 1995). Pueden ser iones, azúcares (trehalosa, sacarosa), polialcoholes (glicerol, sorbitol, manitol) y aminoácidos o derivados (prolina y betaína) (Serrano, 1996).

El efecto específico de la sal, o efecto iónico, se manifiesta en forma de daños en las hojas viejas. La sal entra por la raíz pero se acumula en las hojas debido a la corriente de evapotranspiración. Esta acumulación se produce tanto en el apoplasto (Flowers *et al.*, 1991), como en el interior de la célula. La acumulación de sales en el apoplasto de las hojas provoca un fuerte estrés osmótico (Oertli, 1968). La concentración máxima permisible de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma y orgánulos como el cloroplasto es de alrededor de 100-150 mM, acumulándose el exceso en la vacuola. Cuando la entrada de  $\text{Na}^+$  en la célula supera la capacidad de acumulación de la vacuola, su concentración en el citoplasma aumenta a unos niveles tóxicos

para el funcionamiento normal de los enzimas. Por tanto, ya sea por deshidratación o envenenamiento iónico, dependiendo de si la acumulación de sal ocurre en la pared celular o el citoplasma, las células de las hojas mueren (Munns, 1993), quedando comprometida la supervivencia de la planta.

### 1.3. Obtención de plantas tolerantes a sal.

Las plantas de interés agronómico son organismos con una compleja estructura y desarrollan una respuesta coordinada de los distintos tejidos ante situaciones de estrés. Sin embargo, se ha visto que existe una correlación entre tolerancia a sal de las plantas y la de sus células y tejidos aislados y cultivados *in vitro*. Así, se pueden regenerar plantas más tolerantes a partir de cultivos *in vitro* de células adaptadas a sal, siendo este carácter transmisible a sucesivas generaciones de plantas. El problema es que las plantas así obtenidas presentan otras características no deseables, que las hace inviables para uso agronómico, como una reducción en la expansión celular, que se traduce en una menor producción. Es posible que el fenotipo de tolerancia a sal esté ligado a otros fenotipos no deseables desde el punto de vista agronómico, pero necesarios en el proceso de adaptación (Hasegawa *et al.*, 1994). De todas maneras, estos resultados indican que hay mecanismos de tolerancia a sal que funcionan a nivel celular y que se traducen en tolerancia en la planta completa. Por tanto, la obtención de plantas tolerantes requiere un mejor entendimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y genéticos a nivel molecular que están implicados en adaptación y crecimiento en condiciones de estrés. Hasta el momento el progreso en la obtención de cultivos tolerantes ha sido bastante limitado, ya que la relación entre mecanismos de tolerancia a sal y crecimiento son aún poco conocidos. En cualquier caso, sí está claro cuáles son los mecanismos celulares que pueden considerarse objetivos potenciales de manipulación genética para la obtención de plantas tolerantes. Serían mecanismos relacionados con transporte de iones y compartimentación, síntesis de solutos compatibles, protección oxidativa y procesos metabólicos que son especialmente sensibles (Yeo, 1998).

### 1.4. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo.

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo ideal en investigación biológica. Se trata de un microorganismo eucariótico por lo que puede servir de modelo en el estudio de procesos celulares básicos que se conservan en eucariotas superiores. Tiene un crecimiento rápido, no es patógeno, con lo que se simplifica su manipulación, y puede existir en estado haploide y diploide, permitiendo análisis genéticos. Años de investigación han generado multitud de genotipos y numerosos marcadores auxotróficos. Además la posibilidad de recombinación homóloga junto con los elevados niveles de conversión génica en levaduras permite reemplazar fácilmente genes silvestres por alelos alterados (Guthrie y Fink, 1991).

Finalmente el acceso a la secuencia de nucleótidos del genoma completo de la levadura permite la rápida identificación de genes y el estudio de su expresión en determinadas condiciones mediante los análisis de 'microarrays'. Por todo ello, la levadura *S. cerevisiae* ha sido generalmente el organismo de elección para el aislamiento y caracterización de componentes que pueden tener sus equivalentes funcionales en eucariotas superiores.

### 1.5. Respuesta de la levadura *S. cerevisiae* al estrés osmótico. Ruta HOG.

El efecto del NaCl sobre la levadura ha sido ampliamente estudiado, aunque enfocado especialmente en el componente osmótico. Para mantener la turgencia y la forma, la célula de levadura requiere una osmolaridad interna mayor a la del medio. En general, las células de *S. cerevisiae* son bastante más tolerantes a altas concentraciones de sal que las plantas. Las estirpes W303 ó YPH, de uso muy común en los laboratorios, son capaces de crecer a concentraciones de hasta 10% (1.7 M) de NaCl. Se necesitan concentraciones de sal por encima de 0.3 M para someter a las células de levadura a estrés osmótico (Hohmann, 1997). En estas condiciones, lo primero que ocurre es una rápida pérdida de agua citoplasmática, que se compensa por salida de agua de la vacuola. Más tarde tiene lugar la acumulación de glicerol en el citoplasma a concentraciones molares (Varela *et al.*, 1996). La levadura usa otros osmolitos como arabitol o trehalosa, pero el mecanismo más estudiado es el de acumulación de glicerol. *S. cerevisiae* acumula glicerol a concentraciones intracelulares de 1-1.5 M como respuesta a estrés osmótico. Puede tomarlo directamente del medio por difusión pasiva o sintetizarlo. Ambos procesos están regulados a través de una cascada de señales que se inicia por un estímulo externo y cuyo resultado más significativo es la activación transcripcional de *GPD1*, que codifica el enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. A esta cascada de señales se le denomina ruta HOG (por High Osmolarity Glycerol) y en ella participan un grupo de proteínas kinasas de tipo MAP (Mitogen Activated Protein). Cuando la levadura *S. cerevisiae* se expone a condiciones de alta osmolaridad externa, se desencadena una cascada de señales que se inicia con la percepción del estrés a nivel de membrana y finaliza con la expresión de *GPD1*. Los elementos que componen la cascada se muestran en la Figura 1. La proteína Sln1 consta de un dominio sensor extracelular, y los dominios citoplasmáticos histidina kinasa y receptor. En condiciones de baja osmolaridad, su dominio histidina kinasa se autofosforila en el residuo H576. El grupo fosfato se transfiere a continuación al dominio receptor y posteriormente a la proteína kinasa Ssk1, que permanece inactivo en estado fosforilado. En estas condiciones, se reprime la producción de glicerol. En condiciones de alta osmolaridad, se inactiva Sln1 y se acumula la forma activa de Ssk1 desfosforilada, activando a su vez al par de serina-treonina kinasas Ssk2 y Ssk22 (MAPKKK), que a su vez estimulan la fosforilación de la tirosina de Hog1 (MAPK) a través de Pbs2 (MAPKK). Probablemente Hog1 regula un factor de transcripción que controla la expresión de *GPD1*, correspondiente al enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Este

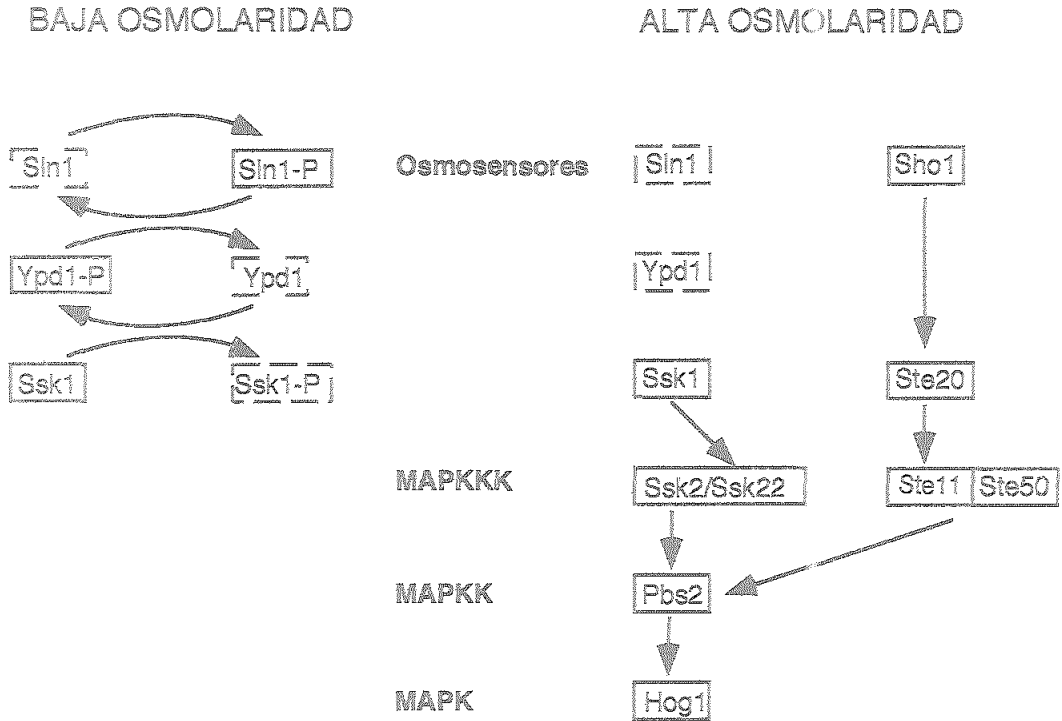


Figura 1. Modelo de la ruta HOG de *S. cerevisiae*. Dos osmosensores estimulan a distintos niveles y por distintos mecanismos una cascada de MAP kinasas. Los recuadros completos indican estado activo; los punteados, estado inactivo. P indica fosforilación (Posas et al. 1996).

factor de transcripción podría ser Hot1, cuya inactivación reduce la transcripción de *GDPI* (Rep *et al.*, 1999). Existe otro osmosensor, Sho1, que a través de Ste20 y Ste11/Ste50 activa también Pbs2. Las dos vías de activación podrían estar diferenciadas en la rapidez en la respuesta y el grado de osmolaridad a la que responden (Maeda *et al.*, 1994, 1995, Posas *et al.*, 1996, 1997, 1998). En la levadura *S. cerevisiae* se conocen otras cuatro rutas de MAP kinasas que regulan de forma independiente la respuesta a feromonas, crecimiento en pseudohifa, esporulación e integridad celular. Es posible que un mismo componente participe en más de una ruta sin que haya interferencias entre ellas como es el caso de Ste11 y Ste50 (Hohmann, 1997).

En plantas parecen existir varias rutas que responden a estrés osmótico causado por desecación, frío o altas concentraciones de sal. En algunas de ellas interviene la hormona de estrés ácido abscísico (ABA). Otras rutas son independientes de ABA y podrían ser cascadas de señales semejantes a la ruta HOG de levaduras. En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, se ha descrito el gen *ATHK1* que codifica una histidina kinasa de tipo híbrido. Esta proteína tiene dos regiones transmembrana en la mitad amino terminal y tiene similitud estructural al osmosensor de levadura Sln1. Athk1 complementó al doble mutante de *S. cerevisiae* carente de osmosensores  $\Delta sln1\Delta sho1$ , suprimiendo la letalidad en medio con alta salinidad y activando la ruta HOG (Urao *et al.*, 1999).

#### 1.6. Homeostasis de iones en *S. cerevisiae*.

Además del efecto inhibitorio debido al estrés osmótico, altas concentraciones de NaCl en el medio reducen el crecimiento de la levadura debido al efecto tóxico del Na<sup>+</sup>. Concentraciones equivalentes de KCl no tienen un efecto tan perjudicial, indicando que el problema proviene de las altas concentraciones de Na<sup>+</sup>, y no de Cl<sup>-</sup> o de la hipertonicidad del medio. La toxicidad del sodio parece ser debida a que interfiere con sitios de unión para otros cationes fisiológicos como K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>. El K<sup>+</sup> es el catión preferido por la célula, no interfiere con los débiles sitios de unión de Mg<sup>2+</sup> y actúa también como osmolito para el mantenimiento de la turgencia celular (Serrano, 1996, 1999). Por tanto las células deben tomar K<sup>+</sup> del exterior, evitando la entrada excesiva de Na<sup>+</sup>.

Los iones, al estar hidratados, no pueden atravesar la doble capa lipídica hidrofóbica de las membranas. El flujo a través de la membrana plasmática tiene lugar mediante transportadores especializados, que pueden ser canales, transportadores secundarios ('carriers') y bombas o transportadores primarios. El paso de solutos a través de la membrana plasmática está energizado, directa o indirectamente, por la H<sup>+</sup>-ATPasa, que retira protones del citoplasma con gasto de energía, dejando el interior de la célula cargada negativamente respecto del exterior. De esta manera se forma un gradiente termodinámico en la que se combinan los

efectos del gradiente eléctrico (potencial de membrana) y el gradiente químico. El paso de solutos de un lado a otro de la membrana depende de este gradiente electroquímico. Los canales median el transporte pasivo a favor del gradiente electroquímico del ion permeado. Los transportadores secundarios acoplan el paso en contra de gradiente de un soluto con el paso a favor de gradiente de otro ya sea en el mismo sentido (simporte) o en sentido contrario (antiporte). Las bombas utilizan energía metabólica para el transporte en contra de gradiente (Niu *et al.*, 1995). En condiciones fisiológica típicas, la concentración de iones en el citoplasma es de  $\approx 100$  mM  $K^+$ , 1-10 mM  $Na^+$  y  $Cl^-$ , 1 mM  $Mg^{2+}$ , 10-200 nM de  $Ca^{2+}$  y  $10^{-7}$  M protones (pH neutro) (Niu *et al.*, 1995, Serrano 1999). En condiciones normales de crecimiento, tanto el  $Cl^-$  como el  $K^+$  están próximos a su potencial de equilibrio, mientras que los iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  tienen una fuerte tendencia a entrar al interior de la célula (Stein 1990).

El  $K^+$  es un elemento indispensable, que la célula debe acumular a veces en contra de gradiente. En la levadura se han identificado las proteínas Trk1 y Trk2 como los principales mediadores de toma de  $K^+$ . El gen *TRK1* codifica un transportador de  $K^+$  adaptado a tomar este catión en diferentes condiciones nutricionales, adaptando su afinidad por  $K^+$  a las concentraciones extracelulares existentes. Para ello debe cambiar su  $K_m$  de valores en el rango milimolar hasta afinidades de 20-30  $\mu M$ . La  $V_{max}$  también varía, dependiendo del pH y contenido de  $K^+$  de la célula. El gen *TRK2* codifica un segundo transportador de  $K^+$  relacionado estructuralmente con Trk1, aunque el valor de su  $K_m$  es mayor que el de Trk1 y su  $V_{max}$  es menor. En ausencia de Trk1 y Trk2, la célula de levadura aún es capaz de tomar  $K^+$  del exterior, posiblemente de manera inespecífica, a través de distintos transportadores. Esta toma de  $K^+$  es de baja afinidad y podría estar asociada a la hiperpolarización de la membrana observada en el mutante  $\Delta trk1 \Delta trk2$  (Madrid *et al.*, 1998). Además de Trk1 y Trk2 se han descrito otros transportadores de  $K^+$  en *S. cerevisiae*. Uno de ellos es un canal rectificador de salida de  $K^+$  que se activa por despolarización de la membrana, codificado por el gen *TOK/YKC1/YORK*. La expresión constitutiva de este gen aumenta la acumulación de potasio en un mutante  $\Delta trk1 \Delta trk2$ , por lo que en determinadas condiciones podría transportar  $K^+$  del exterior al interior de la célula (Fairman *et al.*, 1999). También se ha identificado un supuesto antiportador  $K^+/H^+$  codificado por el gen *KHA1*, cuya mutación produce la alcalinización del citoplasma y una mayor acumulación de  $K^+$  intracelular, que parece acelerar el ciclo celular y la actividad metabólica (Ramírez *et al.*, 1998).

El ión  $Na^+$  puede sustituir al  $K^+$  en ciertos casos. Así se ha comprobado que en *S. cerevisiae* el  $Na^+$  no es necesario cuando el  $K^+$  no es limitante, pero puede recuperar el volumen de la célula, el pH celular y el crecimiento cuando el  $K^+$  es limitante. Quizá sea ésta la razón por la que las células no son completamente impermeables a  $Na^+$ . Probablemente, para obtener los mayores beneficios del  $Na^+$ , el sistema de transporte de  $K^+$  tiene una compleja regulación para permitir una pequeña entrada de  $Na^+$ . Pero cuando los niveles de



$\text{Na}^+$  citoplasmático se hacen demasiado elevados en relación al  $\text{K}^+$ , la célula limita su entrada aumentando la afinidad del transportador de entrada de  $\text{K}^+$ , y pone en marcha un mecanismo de expulsión activa de  $\text{Na}^+$  (Rodríguez-Navarro, 2000). En *S. cerevisiae* la expulsión de  $\text{Na}^+$  depende en gran medida del gen *ENA1*.

El gen *ENA1* codifica una ATPasa (tipo P) de la membrana plasmática cuya función es la expulsión de  $\text{Na}^+$ . Es el primero de un tándem de 4 ó 5 genes, dependiendo de la estirpe. Mientras los genes *ENA2*, 3 y 4 son constitutivos y con un bajo nivel de expresión, *ENA1* se induce por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y pH alcalino. En ausencia de *ENA1* la levadura se hace sensible a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  siendo el fenotipo más acusado si se eliminan además los otros genes del tándem (Garcíadeblas *et al.*, 1993). La mutación en el gen *ENA1* también produce sensibilidad a pH alcalino, siendo incrementada por la adición de  $\text{K}^+$ . Esto sugiere que el producto de *ENA1* también interviene en la expulsión de  $\text{K}^+$  (Haro *et al.*, 1991). Otro mecanismo de expulsión de  $\text{Na}^+$  presente en *S. cerevisiae* es Nha1, un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , descrito por primera vez en *Schizosaccharomyces pombe* y al que se denominó Sod2 (Jia *et al.*, 1992). En *S. cerevisiae* se identificó el gen *NHA1*, cuya disrupción produce un aumento en la sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  de células silvestres (Prior *et al.*, 1996). *NHA1* codifica un antiportador de la membrana plasmática, que media no sólo el transporte de  $\text{Na}^+$  sino también de  $\text{K}^+$ , intercambiando estos cationes por protones. El antiportador Nha1 tiene una doble función. A pH ácido externo Nha1 participa en la regulación de la concentración interna de cationes alcalinos usando el alto gradiente de protones a través de la membrana plasmática como la fuerza motriz para eliminar, en caso necesario, iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  excedentes en el citosol de las células. Cuando el pH del citoplasma aumenta, posiblemente cuando el pH externo está en el límite superior para el crecimiento de *S. cerevisiae*, Nha1 contribuye en el tamponamiento del citosol, utilizando la salida de  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$  para tomar protones. En relación a tolerancia a  $\text{Na}^+$ , la función de Nha1 es complementaria a la de Ena1. Cuando el pH exterior es ácido, Ena1 tiene menos actividad y la expulsión de  $\text{Na}^+$  depende de Nha1. Sin embargo cuando el pH es alcalino, baja la actividad de Nha1 y aumenta la expresión de Ena1, por lo que la salida de  $\text{Na}^+$  depende de ésta (Bañuelos *et al.*, 1998). Se ha identificado otro antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en *S. cerevisiae*. Está codificado por el gen *NHX1* y parece estar localizado en la membrana vacuolar. Su función es la compartimentación de  $\text{Na}^+$  en el interior de la célula. También parece contribuir al mantenimiento del pH citosólico porque la acidificación del citoplasma desencadena la acumulación del mRNA de *NHX1* (Nass *et al.*, 1997, 1998).

En resumen, para mantener un contenido intracelular de  $\text{Na}^+$  que permita la supervivencia en medio salino, la levadura *S. cerevisiae* debe por un lado, limitar la entrada de  $\text{Na}^+$  mediante la regulación de Trk1 y Trk2, y cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  en el interior sobrepasa determinados niveles, debe aumentar la salida al exterior celular mediante las  $\text{Na}^+$ -ATPasas

Ena1-4 ó el antiportador Nha1, o bien acumular  $\text{Na}^+$  en compartimentos intracelulares gracias al antiportador vacuolar Nhx1.

### 1.7. Homeostasis de iones en plantas.

En células de plantas, al igual que en levaduras, el transporte a través de la membrana plasmática depende del potencial electroquímico establecido por la  $\text{H}^+$ -ATPasa, codificada por una familia multigénica, cuya expresión está regulada por inductores químicos y ambientales, incluyendo NaCl. En la membrana vacuolar el gradiente de protones es creado por la actividad de la ATPasa tipo V y la pirofosfatasa del tonoplasto. En condiciones salinas las plantas deben regular el contenido de iones en el citoplasma, en particular  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ . El ión  $\text{Na}^+$  tiene tendencia a entrar en la célula de forma pasiva, a favor de su gradiente electroquímico. No ocurre lo mismo con el  $\text{Cl}^-$ , que debe entrar en contra de gradiente. El transporte de estos iones debe ser considerada en dos contextos celulares: después del choque salino y tras el reestablecimiento de la homeostasis iónica. Inmediatamente después de la imposición de un estrés salino, el gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  se ve alterado. La entrada masiva de  $\text{Na}^+$  disipa el potencial de membrana, facilitando la entrada de  $\text{Cl}^-$  a favor de gradiente. Se ha implicado un canal de aniones en este flujo pasivo. Sin embargo, cuando se reestablece el equilibrio y el potencial de membrana vuelve a ser de -120 a -200 mV, la entrada de  $\text{Cl}^-$  tiene lugar probablemente mediante un simporte  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Hasegawa *et al.*, 2000). En lo que se refiere al  $\text{Na}^+$ , su entrada ocurre a través de los transportadores de  $\text{K}^+$ .

En plantas se han identificado varios transportadores de  $\text{K}^+$  por complementación de mutantes *trk* de *S. cerevisiae* con librerías de cDNA de plantas. Se pueden distinguir tres tipos: (1) Hkt1, con homología con el transportador Trk de levaduras; (2) Hak1/Kt1/Kup1, transportador de  $\text{K}^+$  de alta afinidad (High-Affinity-K<sup>+</sup> transporter) y (3) canales de  $\text{K}^+$  (Rodríguez-Navarro, 2000). Parece que la entrada de  $\text{Na}^+$  tiene lugar a través de Hkt1 y los canales de  $\text{K}^+$ . Rubio *et al.*, (1995) demostraron que Hkt1 es un cotransportador  $\text{K}^+$ - $\text{Na}^+$ . Bajas concentraciones de  $\text{Na}^+$  estimulan el transporte de  $\text{K}^+$  por HKT1 expresado en sistemas heterólogos. La entrada de  $\text{Na}^+$  a su vez se estimula por  $\text{K}^+$ . Sin embargo, altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  inhiben la entrada de  $\text{K}^+$  en oocitos, lo que sugiere que HKT1 podría ser una vía de entrada de  $\text{Na}^+$  en células de plantas en condiciones de alto contenido de  $\text{Na}^+$  en el exterior. Los canales de  $\text{K}^+$  pueden ser rectificadores de corriente, que transportan  $\text{K}^+$  al interior (inward-rectifying channels) o al exterior de la célula (outward rectifying channels); o bien canales independientes de voltaje. Hay canales como AKT1 de *A. thaliana* (canal rectificador de entrada de  $\text{K}^+$ ) que tienen un alto grado de selectividad por  $\text{K}^+$  en condiciones fisiológicas, sin embargo podrían mediar la entrada de  $\text{Na}^+$  cuando aumenta la concentración de este ión en el exterior (Blumwald *et al.*, 2000).

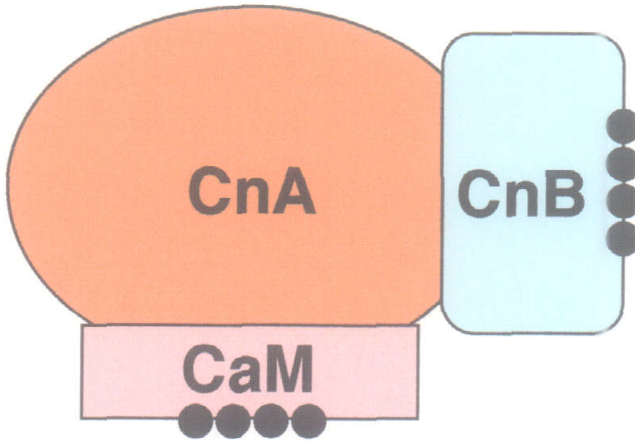
El exceso de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma de la célula se debe expulsar mediante un proceso activo, en contra de su potencial electroquímico. En varias especies de plantas se han encontrado antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática que median la salida de  $\text{Na}^+$  al exterior. Otra posibilidad es aprovechar el  $\text{Na}^+$  como osmolito, acumulándolo en el interior de compartimentos intracelulares, fundamentalmente la vacuola. Así, se ha visto que plantas tolerantes a  $\text{NaCl}$  acumulan grandes cantidades de  $\text{Na}^+$  en la vacuola. Se han identificado antiportadores de plantas capaces de complementar a un mutante en el antiportador vacuolar (Nhx) de levadura (Quintero *et al.*, 2000). La sobreexpresión de una de estas proteínas aumenta la tolerancia de *Arabidopsis*, confirmando la función del transportador en la compartimentación de  $\text{Na}^+$  (Blumwald *et al.*, 2000).

### 1.8. Calcineurina.

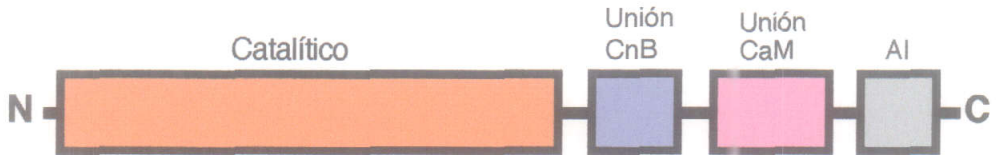
Calcineurina se purificó por primera vez de tejido cerebral bovino y se describió como una proteína que une calmodulina y cuatro  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de proteína con gran afinidad. Su nombre refleja la propiedad de unir átomos de calcio y su abundancia en el tejido nervioso (Klee *et al.*, 1979). Calcineurina, o proteína fosfatasa 2B (PP2B), es una de las cuatro clases principales de proteínas fosfatasas específicas para fosfoserina/fosfotreonina que se distinguen entre sí por su sensibilidad a inhibidores y el requerimiento de cationes divalentes *in vitro* (Cohen *et al.*, 1989). Calcineurina es la única proteína fosfatasa conocida que está regulada específicamente por  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina. Esto sugiere que calcineurina podría tener un papel importante en la mediación de los cambios en el estado de fosforilación de proteínas en respuesta a fluctuaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad catalítica, calcineurina A, y una subunidad reguladora, calcineurina B. La subunidad A (CnA) une calmodulina con alta afinidad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la subunidad B une cuatro átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma directa (Figura 2). La subunidad B (CnB) es similar a calmodulina en su secuencia primaria, pero estas proteínas no son funcionalmente equivalentes. CnB permanece fuertemente asociada a CnA tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el complejo A.B es inactivo, parcialmente activo si se añade  $\text{Ca}^{2+}$ . La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina al complejo A+B da lugar al enzima totalmente activo (Klee *et al.*, 1988). La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a CnB estimula la actividad fosfatasa de calcineurina, pero esta actividad es baja comparada con la que se obtiene en presencia de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . La unión de CaM incrementa la  $V_{max}$ , mientras que la subunidad CnB disminuye la  $K_m$  por el sustrato, con un menor efecto sobre la  $V_{max}$  del enzima (Perrino *et al.*, 1995).

A



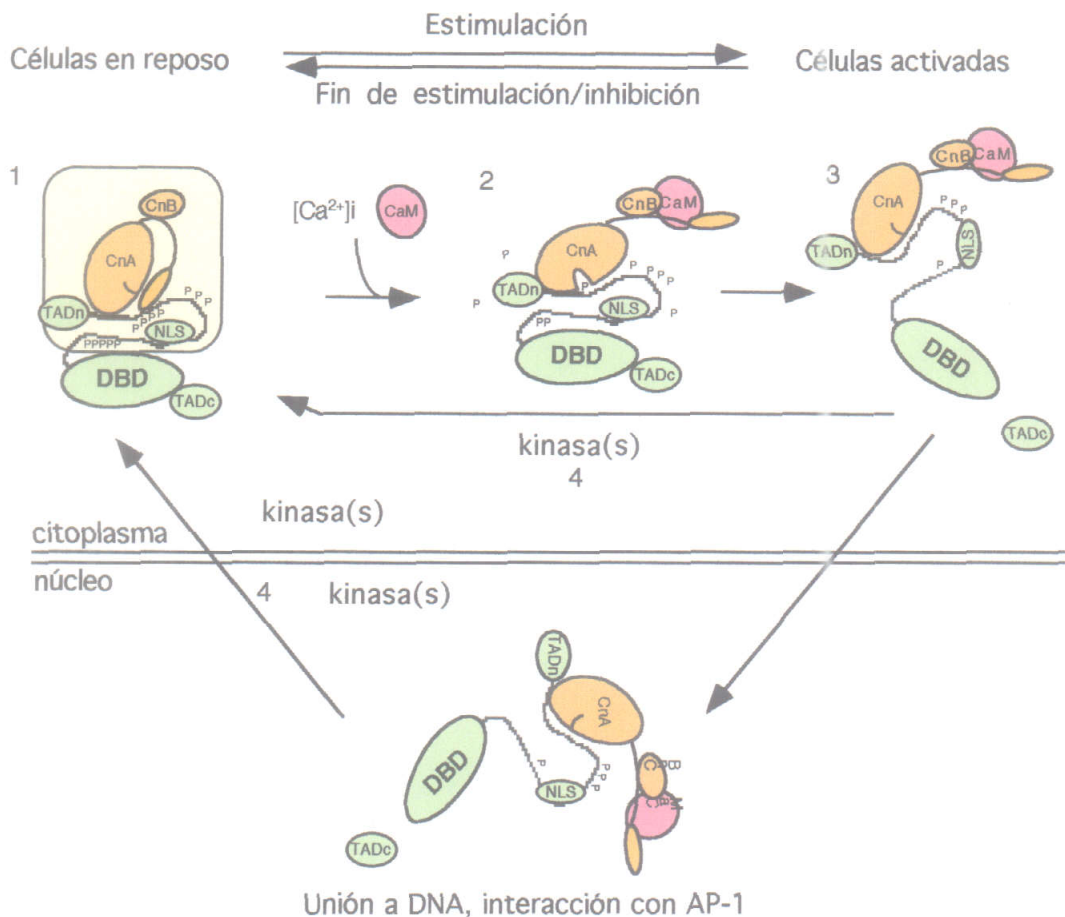
B



**Figura 2.** (A) Complejo activo calcineurina. Cna representa la subunidad catalítica, Cnb la subunidad reguladora y CaM es calmodulina. Los círculos oscuros representan átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a CaM y CnB (B). Dominios funcionales identificados en la subunidad catalítica (CnA) de calcineurina. La región amino terminal contiene el dominio catalítico con actividad proteína fosfatasa. Las cajas representan el dominio de unión a CnB, a calmodulina y el dominio autoinhibidor (AI).

Calcineurina es una proteína bastante conservada y ampliamente distribuída entre los eucariotas, aunque su existencia en vegetales no ha sido demostrada de manera concluyente. Genes que codifican para las subunidades A y B se han identificado en levaduras, hongos filamentosos, protozoos, insectos y mamíferos (Rusnak y Mertz, 2000). En plantas, una proteína fosfatasa con características bioquímicas similares a las de calcineurina media la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula la entrada de  $\text{K}^+$  (Luan *et al.*, 1993) y  $\text{Ca}^{2+}$  (Allen, 1994) en células guardas de los estomas de *Vicia faba*. En mamíferos calcineurina tiene un papel esencial en la activación de los linfocitos T, siendo el blanco de agentes inmunosupresores como ciclosporina A y FK506 que se utilizan en el tratamiento del rechazo de órganos transplantados. Para que los linfocitos T se activen y proliferen es necesario que se expresen genes de respuesta inmune como el de interleukina 2, a cuyo promotor se unen los factores de transcripción NFAT y NFIL2 (Liu *et al.*, 1991b; Clipston *et al.*, 1992). En presencia de un antígeno tiene lugar una cascada de señales en los linfocitos T, por la que iones  $\text{Ca}^{2+}$  (segundo mensajero) se unen a calmodulina, dando lugar a la unión de calmodulina con calcineurina, que así activada desfosforila la subunidad citoplasmática I $\kappa$ B del complejo NFAT. Esta desfosforilación resulta en la liberación de NFAT y su translocación del citoplasma al núcleo, donde actúa como activador transcripcional del gen de la interleukina (Liu, 1993). En la Figura 3 se muestra un modelo del funcionamiento de calcineurina en la activación de proteínas NFAT. Los inmunosupresores ciclosporina A y FK506 bloquean la cascada de señales interfiriendo con la actividad calcineurina. Para ello forman complejos con proteínas abundantes, ubicuas, y bastante conservadas, llamadas ciclofilinas e inmunofilinas. Ciclosporina A se une a la ciclofilina A y FK506 a la inmunofilina FKBP12. Cárdenas *et al.*, (1994) han propuesto que el papel de las ciclofilinas e inmunofilinas en condiciones normales es la regulación de la actividad calcineurina.

Mediante proteólisis limitada de la subunidad catalítica usando clostripaina, una proteasa específica para arginina, Hubbard *et al.*, (1989) identificaron cuatro dominios bien diferenciados en la subunidad catalítica CnA de la calcineurina bovina: (1) una región catalítica en la zona amino terminal, muy similar a proteínas fosfatasas tipo 2A, (2) un sitio de unión a la subunidad reguladora CnB, (3) un sitio de unión de calmodulina y (4) un dominio autoinhibidor en el extremo carboxilo (Figura 2). Este dominio autoinhibidor funciona como un inhibidor competitivo que se une al sitio activo del enzima. Aparentemente, la unión de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  a CnA activa calcineurina al desplazar al dominio autoinhibidor. Así, la eliminación de los dominios autoinhibidor y de unión a calmodulina produce una calcineurina constitutivamente activa *in vitro*, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulina}$ . Es posible que este dominio autoinhibidor regule no solamente la actividad catalítica sino también la asociación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de calcineurina con el complejo FK506-FKBP12 (Parsons *et al.*, 1994).



**Figura 3. Modelo de activación de proteínas NFAT por calcineurina.** (1) NFAT interacciona con calcineurina (CnA y CnB, naranja) y es retenido en el citoplasma por un complejo de otras proteínas (amarillo) en células T en reposo. En ausencia de un estímulo por  $Ca^{2+}$ , el dominio autoinhibidor de CnA bloquea el sitio de actividad catalítica de CnA y calcineurina permanece inactiva. Las regiones funcionales identificadas en NFAT (verde) se denominan TADn por dominio de transactivación N-terminal (N-terminal TrAnsactivation Domain), NLS por secuencia de localización nuclear (Nuclear Localization Sequence), DBD por dominio de unión a DNA (DNA Binding Domain), y TADc por dominio de transactivación C-terminal (C-terminal TrAnsActivation Domain). En estado de reposo, la fosforilación de las proteínas NFAT enmascara NLS y los residuos en DBD que contactan con el DNA. (2) La unión de calmodulina (CaM, rosa) estimulada por el incremento en calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) produce un cambio conformacional en calcineurina que desplaza el dominio autoinhibidor del sitio activo. La calcineurina activada desfosforila NFAT. (3) La desfosforilación produce un cambio conformacional en las proteínas NFAT que expone NLS y los residuos que contactarán con el DNA, resultando en su importación al núcleo e incremento en la actividad de unión a DNA. (4) La retirada de  $Ca^{2+}$  o la inhibición de calcineurina da lugar a refosforilación de las proteínas NFAT por quinasas no identificadas. La refosforilación de proteínas NFAT las devuelve a su estado original en el citoplasma (Adaptado de Rao, Luo & Hogan, 1997)

En *S. cerevisiae* se han encontrado homólogos a la calcineurina de mamíferos. Los genes *CNA1* y *CNA2* codifican para dos isoformas de la subunidad A (Liu *et al.*, 1991) y *CNB1* dirige la síntesis de la subunidad B (Kuno *et al.*, 1991). El tamaño de la proteína Cna1 es de 60 kDa, Cna2 tiene 64 kDa y Cnb1, 16 kDa. Cyert *et al.*, (1991, 1992) obtuvieron mutantes carentes de una calcineurina funcional. Estos mutantes eran viables, pero incapaces de continuar el crecimiento si eran expuestos de forma continuada a la feromona factor  $\alpha$ , quedando paradas en G<sub>1</sub> concluyéndose por tanto que calcineurina era necesaria en el proceso de desensibilización de las células a la feromona (Cyert *et al.*, 1991, 1992). En nuestro laboratorio y en otros (Nakamura *et al.*, 1993) se han encontrado evidencias de que calcineurina es esencial para la tolerancia a Na<sup>+</sup> en la levadura *S. cerevisiae*.

### 1.9. Factores de transcripción de tipo bZip.

Las señales generadas por la célula cuando recibe determinados estímulos debe dar lugar a una respuesta adecuada a cada caso, por ejemplo mediante cambios en la expresión de ciertos genes mediados por factores de transcripción. Un grupo importante de factores de transcripción regulados por señal son las proteínas denominadas bZip, llamadas así por los dominios conservados básicos de unión a DNA (B) y de cremallera de leucinas (Zip) para la dimerización. Estos factores específicos de secuencia tienen una estructura modular que consiste en dominios claramente diferenciados de (1) unión a DNA, (2) dimerización y (3) activación de la transcripción. Los miembros más estudiado de esta superfamilia son las proteínas AP-1 (Jun/Fos) y CREB/ATF. Las primeras controlan la expresión génica mediante unión al elemento de respuesta a TPA (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate), denominada TRE. Las últimas se unen al elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE) (Karin *et al.*, 1992).

AP-1 se definió originalmente como actividad de unión a DNA que reconoce el elemento de respuesta TRE y es responsable de la inducción transcripcional de un número de genes en respuesta a la activación por la proteína quinasa C (PKC). Posteriormente se reveló que AP-1 consiste en una colección de factores de transcripción estructuralmente relacionados que pertenecen a las familias Jun y Fos, que se asocian para formar una variedad de homo y heterodímeros, todas capaces de reconocer TRE. Como todos los miembros de la familia bZip, los componentes de AP-1 deben dimerizarse antes de la unión a DNA. Las proteínas Jun unen DNA tanto como homodímeros Jun-Jun como heterodímeros, mientras que las proteínas Fos deben heterodimerizarse con una de las proteínas Jun, ya que no pueden formar dímeros Fos-Fos estables. Debido a su mayor estabilidad, los dímeros Jun-Fos exhiben más actividad de unión a DNA y capacidad de transactivación que los correspondientes dímeros Jun-Jun. Diferentes combinaciones entre las proteínas Jun y Fos dan lugar a dímeros con distintas actividades, aunque la especificidad por la secuencia parece ser muy similar. Todos



estos dímeros supuestamente contribuyen a la actividad AP-1 y participan en diferente grado en su regulación por estímulos extracelulares. Debe considerarse a los factores AP-1 como mensajeros nucleares que median la acción de rutas de transducción de señales estimuladas por factores de crecimiento, hormonas, citokinas y neurotransmisores (Karin *et al.*, 1992).

#### 1.10. Regulación transcripcional por estrés.

En la levadura *S. cerevisiae* el factor AP-1 mejor caracterizado es Gcn4, que activa de forma coordinada la transcripción de al menos 40 genes en respuesta a hambre de aminoácidos y otras circunstancias ambientales (Fernandes *et al.*, 1997). Otros factores de transcripción AP-1 son Yap1 y Yap2, que están involucrados en mecanismos de resistencia a vaarios tipos de droga y metales. La sobreexpresión de cualquiera de las dos proteínas da lugar a resistencia a drogas como cicloheximida y tolerancia a niveles normalmente tóxicos de metales como Cd y Zn (Wu *et al.*, 1993). Mutaciones en *YAP1* o *YAP2* producen sensibilidad a agentes oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Stephen *et al.*, 1995). Los factores de transcripción tipo AP-1 reconocen y se unen a las secuencias TGA<sub>n</sub>CTCA (en algunos casos TTACTAA) en el promotor de los genes que regulan (Fernandes *et al.*, 1997). Sin embargo, Yap1 parece estar también implicado en mecanismos de respuesta general a estrés, regulando la transcripción a través de la secuencia de reconocimiento STRE (CCCCT), aunque de manera indirecta (Gounalaki *et al.*, 1994).



## 2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. MATERIALES.

#### 2.1.1. Productos químicos y bioquímicos.

En este trabajo se han utilizado reactivos procedentes de las firmas Difco Laboratories (Detroit, EE.UU.), Merck (Darmstad, Alemania), Panreac Química (Barcelona, España), Serva (Heidelberg, Alemania) y Sigma Chemical co. (St. Louis, EE.UU.).

Los enzimas de restricción procedieron de Boehringer Mannheim GmbH y Promega Biotech, y se usaron con tampones suministrados por los fabricantes. La DNA ligasa del bacteriófago T4, fosfatasa alcalina de intestino de ternera y RNasa A se obtuvieron de Boehringer Mannheim GmbH; la lítica de Sigma. La Taq I DNA polimerasa se obtuvo de Promega Biotech o se preparó en el laboratorio (Pluthero, 1993).

El kit de marcaje radiactivo de DNA procedía de Boehringer Mannheim GmbH. El kit de secuenciación de United States Biochemical Corp. y Promega Biotech.

#### 2.1.2. Material biológico.

Se usaron las estirpes DH5 $\alpha$  y XL1 - Blue (Tabla 3) de la bacteria *Escherichia coli* para la amplificación de plásmidos.

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se describen en las Tablas 1 y 2.

Se utilizó la estirpe GRF167-b (*MATa, ura3, his3, GAL<sup>+</sup>*) para obtener mutantes sensibles a sal. Para realizar los estudios genéticos de estos mutantes se crearon estirpes parcialmente congénicas a GRF167 y de talo opuesto. Para ello se cruzó GRF167-b con la estirpe BWG1-7a (*MATa, ade1-100, ura3-52, leu2-3,112, his4-519 GAL<sup>+</sup>*), y luego se hicieron retrocruzamientos, seleccionando siempre segregantes con las características de GRF167 o alguno de sus mutantes. En la Tabla 3 se describe algunas estirpes utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. Relación de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en esta Tesis.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>S. cerevisiae</i>		
BWG1-7a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade1-100, ura3-52, leu2-3,112, his4-519 GAL<sup>+</sup></i>	Becker & Guarante (1991)
DBY746	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289</i>	(a)
DMY14	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3-11, leu2-112, trp1-1, ade2-1, ura3-1, [<math>\Delta</math>(<i>tcn1</i>)::G418]</i>	Matheos et al. (1997)
F4	<i>MAT<math>\alpha</math>, thr4</i>	(b)
F15	<i>MAT<math>\alpha</math>, thr4, arg3</i>	(b)
G19	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3-11, leu2-3, leu2-112, trp1-1, ade2-1, ura3-1, [<math>\Delta</math>(<i>ena1-4</i>)::HIS3]</i>	Quintero et al. (1996)
GRF167-a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, his3, GAL<sup>+</sup></i>	(c)
GRF167-b	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, his3, GAL<sup>+</sup></i>	Esta Tesis
H405	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1, can1-100, his3-11, 5, leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, [<math>\Delta</math>(<i>pam1</i>)::LEU2]</i>	Hu et al. (1994)
MCY5-2a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200, leu2-<math>\Delta</math>1, [<math>\Delta</math>(<i>cna1</i>)::URA3-<i>hisG</i>]</i>	Cyert et al. (1991)
MCY-400:	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200, leu2-<math>\Delta</math>1, [<math>\Delta</math>(<i>cna2</i>)::HIS3]</i>	Cyert et al. (1991)
MCY100-14A:	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200, leu2-<math>\Delta</math>1, [<math>\Delta</math>(<i>cna1</i>)::URA3-<i>hisG</i>, <math>\Delta</math>(<i>cna2</i>)::HIS3]</i>	Cyert et al. (1991)
RH16	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>ena1-4</i>)::LEU2]</i>	Haro et al. (1991)
RH2	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>trk1</i>)::LEU2]</i>	Haro et al. (1993)
RHW21 $\alpha$	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, leu2, trp1, his3, ade2-1, can1-100, [<math>\Delta</math>(<i>ena1-4</i>)::LEU2]</i>	(d)
RHW23a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, leu2, trp1, his3, ade2-1, can1-100, [<math>\Delta</math>(<i>ena1-2</i>)::LEU2]</i>	(d)
TE12	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, trp1, his3, ade2, [<math>\Delta</math>(<i>ena1-4</i>)::LEU2, <math>\Delta</math>(<i>trk1</i>)::LEU2]</i>	Haro et al. (1993)
W303-1A	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3-11, leu2-112, trp1-1, ade2-1, ura3-1</i>	Wallis et al. (1989)
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3-11, leu2-112, trp1-1, ade2-1, ura3-1</i>	Wallis et al. (1989)
YPH-499	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200, leu2-<math>\Delta</math>1</i>	Sikorski (1989)

(a) Botstein D., Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139.

(b) López Calderón I., Dpto de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

(c) Fink G., Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology, Nine Cambridge Center, Cambridge, MA 02142-1479.

(d) Rodríguez Navarro A., E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

Tabla 2. Estirpes obtenidas en el laboratorio.

ESTIRPE	GENOTIPO	PARENTALES
JP1	<i>MATa, ade1, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup></i>	GRF167 x BWG1-7a
JP2	<i>MATa, ade1, ura3, GAL<sup>+</sup></i>	GRF167 x BWG1-7a
JP3	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math>, ade1, leu2, GAL<sup>+</sup></i>	SS2 x JP1
JP3-5b	<i>MATa, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup>, cnb1</i>	SS2 x JP1
JP4-5c	<i>MATa, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup></i>	GRF167 x JP1
JP4-7a	<i>MATa, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup></i>	GRF167 x JP1
JP5-1b	<i>MATa, his3, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup></i>	SS10 x JP1
JP5-9c	<i>MATa, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup>, nls2</i>	SS10 x JP1
JP5-11b	<i>MATa, ade1, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup>, nls2</i>	SS10 x JP1
JP6-3b	<i>MATa, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup>, SS21</i>	SS21 x JP1
JP6-4a	<i>MATa, ade1, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup>, SS21</i>	SS21 x JP1
JP7	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math>, ura3, GAL<sup>+</sup>, cnb1, nls2</i>	SS10 x JP3-5
JP8	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math>, his3, ura3, GAL<sup>+</sup>, cnb1, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	SS2 x JP23
JP9	<i>MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200, leu2-<math>\Delta</math>1, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	YPH499
JP10	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math>, his3, ura3, GAL<sup>+</sup>, nls2, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	SS10 x JP11
JP11	<i>MATa, his3, ura3, GAL<sup>+</sup>, [<math>\Delta</math>(<i>yap4</i>)::HIS3]</i>	GRF167a
JP12	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, ura3, GAL<sup>+</sup>, [<math>\Delta</math>(<i>cad3</i>)::URA3]</i>	GRF167b
JP13-1	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, ura3, [<math>\Delta</math>(<i>yap4</i>)::HIS3], [<math>\Delta</math>(<i>cad3</i>)::URA3]</i>	JP11 x JP12
JP13-2	<i>MATa, his3, ura3, [<math>\Delta</math>(<i>yap4</i>)::HIS3], [<math>\Delta</math>(<i>cad3</i>)::URA3]</i>	JP11 x JP12
JP14	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	DBY746
JP15	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>hog1</i>)::TRP1]</i>	DBY746
JP16	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, his3, leu2, trp1, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3], [<math>\Delta</math>(<i>hog1</i>)::TRP1]</i>	JP15
JP17	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>bcy</i>)::HIS3]</i>	DBY746
JP18	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3], [<math>\Delta</math>(<i>ena1-4</i>)::LEU2]</i>	RH16
JP19	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-<math>\Delta</math>1, leu2-3, leu2-112, trp1-289, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3], [<math>\Delta</math>(<i>trk1</i>)::LEU2]</i>	RH2
JP20	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, ura3, GAL<sup>+</sup>, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	GRF167b
JP21	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, trp1, his3, ade2, [<math>\Delta</math>(<i>ena1-4</i>)::LEU2], [<math>\Delta</math>(<i>trk1</i>)::LEU2], [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	TE12
JP22	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, ura3, [<math>\Delta</math>(<i>yap4</i>)::HIS3]</i>	GRF167b
JP23	<i>MATa, his3, leu2, ura3, GAL<sup>+</sup>, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	JP5-1b
JP24	<i>MATa, his3-11, leu2-112, trp1-1, ade2-1, ura3-1, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	W303-1A
JP25	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3-11, leu2-112, trp1-1, ade2-1, ura3-1, [<math>\Delta</math>(<i>cnb1</i>)::HIS3]</i>	W303-1B

JP26	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>yap4</i> ):: <i>HIS3</i> ]	W303-1B
JP27	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>hog1</i> ):: <i>TRP1</i> ]	W303-1A
JP28	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>hog1</i> ):: <i>TRP1</i> ]	W303-1B
JP29	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>cnb1</i> ):: <i>HIS3</i> ], [ $\Delta$ ( <i>hog1</i> ):: <i>TRP1</i> ]	W303-1B
JP30	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>fks2</i> ):: <i>HIS3</i> ]	W303-1A
JP31	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>yap4</i> ):: <i>HIS3</i> ], [ $\Delta$ ( <i>cnb1</i> ):: <i>HIS3</i> ]	W303-1A
JP32	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>yap4</i> ):: <i>HIS3</i> ], [ $\Delta$ ( <i>cnb1</i> ):: <i>HIS3</i> ]	W303-1B
JP33	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>yap4</i> ):: <i>HIS3</i> ], [ $\Delta$ ( <i>hog1</i> ):: <i>TRP1</i> ]	W303-1A
JP34	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>yap4</i> ):: <i>HIS3</i> ], [ $\Delta$ ( <i>hog1</i> ):: <i>TRP1</i> ]	W303-1B
JP35	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>tcn1</i> ):: <i>G418</i> ], [ $\Delta$ ( <i>yap4</i> ):: <i>HIS3</i> ]	DMY14
JP36	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , [ $\Delta$ ( <i>pmr1</i> ):: <i>HIS3</i> ]	GRF167a
JP37	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3-11</i> , <i>leu2-112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , [ $\Delta$ ( <i>cnb1</i> ):: <i>HIS3</i> ]	W303
JP38	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>GAL<sup>+</sup></i> , <i>nls2</i> , [ $\Delta$ ( <i>cnb1</i> ):: <i>HIS3</i> ]	SS10

Tabla 3. Relación de cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lac</i> <i>U169</i> (80 <i>LacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ) <i>hsdR17</i>	Hanahan (1983)
XL1-Blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	
	<i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA46t</i> <i>hi</i>	Bullock et al. (1987)
	<i>relA1</i> <i>lac</i>	
	<i>F'</i> [ <i>proAB<sup>+</sup></i> <i>lacI<sup>q</sup></i> <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> <i>Tn10</i> ( <i>ter</i> )]	

## 2.2. METODOS.

### 2.2.1. Medios y condiciones de crecimiento.

#### 2.2.1.1. Bacterias

Las bacterias se crecieron en medio LB (1% Bacto-Tryptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl). Para solidificar el medio se añadió 15 g/L . La esterilización se hizo autoclavando 20 min a 120°C y 1 atmósfera de sobrepresión. Para preparar células competentes se crecieron las bacterias en medio  $\psi$  (2% Bacto-Tryptona, 0.5% extracto de levadura), 15 mM MgSO<sub>4</sub> y 10 mM KCl.

Para seleccionar plásmidos en las células bacterianas se añadió 50 mg/L de ampicilina (Boehringer Mannheim) al medio esterilizado y enfriado a  $\approx$ 50°C.

Para la conservación de bacterias conteniendo plásmidos de interés se añadió 15% de glicerol estéril a cultivos bacterianos y se guardaron a -70°C.

#### 2.2.1.2. Levaduras

Se siguieron las técnicas de manipulación y crecimiento de levaduras descritas en los libros de Guthrie y Fink (1991) y Ausubel *et al.* (1996).

Las levaduras se crecieron a 30°C salvo excepciones, que se indican en cada caso. Para el crecimiento rutinario se usó medio rico YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa). Para solidificar el medio se añadió 2% de agar. Cuando fue necesario el mantenimiento de plásmidos se usó medio mínimo YNB (0.17% Yeast nitrogen base w/o aminoacids, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 2% dextrosa) al que se añadieron los aminoácidos necesarios para cada cepa a las concentraciones indicadas en Ausubel *et al.* (1996). Para seleccionar cepas con auxotrofia para uracilo se usó 1g/L de ácido fluoroorótico (FoA, F5013, Sigma), esterilizado por filtración y añadido al medio autoclavado y enfriado. El pH se ajustó a 6.0 con NaOH. Para preparar medio tamponado se utilizó Tris base a una concentración de 100 mM final, añadiendo MES de una solución 1M hasta pH 8.0; o bien se utilizó MES a una concentración de 100 mM final añadiendo Tris base de una solución 1 M hasta pH 5.5.

Las sales, osmolitos y otros inhibidores del crecimiento utilizados en los experimentos de tolerancia se añadieron al medio de cultivo antes de la esterilización en el autoclave cuando

era posible. Si existían problemas de precipitación o inactivación por calor, el compuesto a añadir se esterilizó por filtración y se añadió al medio ya estéril.

Para el crecimiento de levaduras en condiciones de bajo potasio se utilizó el medio AP [8mM ácido fosfórico, 10 mM L-arginina, 2 mM sulfato de magnesio, 0.2 mM cloruro de calcio, y 2% glucosa, llevando el pH a 6.5 con arginina; más vitaminas (0.02 mg/mL biotina, 0.4 mg/L niacina, 0.4 mg/L piridoxina, 0.4 mg/L tiamina y 0.4 mg/L ácido pantoténico) y elementos traza (0.5 mg/L de ácido bórico, 0.04 mg/L de sulfato cúprico, 0.1 mg/L de ioduro potásico, 0.2 mg/L cloruro férrico, 0.4 mg/L sulfato de manganeso, 0.2 mg/L molibdato de sodio y 0.04 mg/L sulfato de zinc], descrito por Rodríguez Navarro y Ramos (1984).

Para el crecimiento de levaduras en condiciones de bajo nitrógeno se utilizó el medio SLAD [0.17% YNB-AAS, 50 $\mu$ M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% glucosa] (Gimeno *et al.*, 1992). Para medio sólido se añadió 2% de agar previamente lavado en agua.

Para inducir la esporulación se usó medio SPO (0.1% extracto de levadura, 1% acetato potásico, 0.05% glucosa) líquido o solidificado con 2% agar. La temperatura de incubación fue de 30°C para cultivos líquidos y  $\approx$ 25°C para medio sólido. Antes de la esporulación las células se cultivaron en medio medio sólido YPD o medio de preesporulación PSP (0.8% extracto de levadura, 0.3% peptona, 10% glucosa), cuando se trataba de cepas que esporulaban con dificultad (Guthrie y Fink, 1991).

Las cepas de interés se guardaron a -70°C después de añadir 15% de glicerol estéril a una suspensión de células en medio de cultivo.

## 2.2.2. Técnicas de análisis genético.

### 2.2.2.1. Construcción de diploides.

Los diploides se construyeron por conjugación de haploides de talos opuestos en placas con medio sólido YPD. Se mezclaron en la superficie del medio células procedentes de colonias en crecimiento de cada haploide parental, haciendo un círculo de  $\approx$ 0.5 cm con ayuda de un palillo. Se incubó la placa a 30°C durante al menos 4 horas para permitir la conjugación. Los diploides se seleccionaron por complementación de auxotroffías. Se tomaron células de la mezcla conjugante y se sembraron en placa selectiva YNB más los aminoácidos necesarios que permitieran sólo el crecimiento del diploide.

### 2.2.2.2. *Esporulación y análisis de esporas.*

El aislamiento de esporas se basó en el método descrito en Guthrie y Fink (1991). Células diploides se incubaron a 30° C en 5 mL de medio de esporulación líquido a una densidad de  $\approx 2 \times 10^7$  cél/mL durante 3-7 días. La acumulación de ascas se comprobó por observación de muestras al microscopio. Cuando el cultivo estaba suficientemente enriquecido de ascas se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril. Para digerir las paredes de las ascas se añadieron 100 unidades de liticasa (L2524, Sigma) a una concentración de 25 U/ $\mu$ L en tampón 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 % glicerol y 10  $\mu$ L Tris/HCl 1 M (pH 7.5), y se incubó la suspensión a 30° C de 15 a 60 minutos. Se finalizó el tratamiento con la liticasa cuando las esporas aún se encontraban asociadas en ascas pero de manera más laxa que al inicio. Para retirar la liticasa se recogieron las células por centrifugación y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 1 mL de agua estéril, se repitió la centrifugación y se retiró el sobrenadante. Para enriquecer de esporas la preparación se utilizó el método de aislamiento basado en la hidrofobicidad relativa de las esporas comparada con células vegetativas. Se resuspendieron las células en 100  $\mu$ L de agua estéril y se agitaron en el vórtex  $\approx 2$  minutos a la velocidad máxima manteniendo el tubo en posición vertical. Las esporas se adhieren entre sí y a las paredes del tubo, mientras que las células vegetativas permanecen en la solución acuosa, y se eliminan al retirar la suspensión y lavando el tubo con agua estéril 3-5 veces. Las esporas se resuspendieron añadiendo al tubo 1 mL de una solución 0.01% de Nonidet P-40, y sonicando durante 30 segundos a 5 W en un sonicador Braun-Sonic 2000 equipado con un microtip. Alternativamente se utilizó un baño por ultrasonidos Selecta de 150 W de potencia, manteniendo el tubo sumergido durante  $\approx 1$  minuto. La densidad de esporas se calculó al microscopio con ayuda de una cámara de recuento. Finalmente se hicieron diluciones y se extendieron las esporas en medio sólido YPD para su germinación. Con este método se consiguieron preparaciones de esporas de hasta 99% de pureza, con una viabilidad de 20-45% (relación entre número de colonias aparecidas y número de esporas sembradas).

### 2.2.2.3. *Construcción de estirpes isogénicas de talos opuestos.*

Las estirpes de levadura que se utilizan habitualmente en el laboratorio son haploides y de talos estables y bien diferenciados: las células MAT $\alpha$  sólo producen células que son MAT $\alpha$ , y las células MAT $\alpha$  dan lugar a células que son MAT $\alpha$ . Las levaduras naturales sin embargo, tienen la habilidad de cambiar de talo en cada generación, lo que depende, entre otros, del gen de homotalismo (*HO*). El gen *HO* codifica para una endonucleasa de sitio específico que corta las dos cadenas de DNA dentro del locus MAT, permitiendo la sustitución del alelo  $\alpha$  por  $\alpha$  o viceversa. Para que esto sea posible existe una copia

silenciada de cada alelo situada a ambos lados del locus MAT, en los locus denominados HML y HMR (Homotallic copies to the Left and Right of MAT). La estabilidad en el talo de las estirpes de laboratorio (heterotáticas) se debe a un gen HO defectuoso; la mayoría llevan los alelos HML $\alpha$  y HMRA, por lo que la introducción de un gen HO funcional permite la interconversión de talos (Guthrie y Fink, 1991). Se tiene así la posibilidad de cambiar el talo de levaduras de laboratorio, obteniendo estirpes isogénicas que se pueden cruzar con el parental o un mutante, lo que permite estudios comparativos más precisos.

Para cambiar el talo de una estirpe se transformaron células con el plásmido YCp50-HO, que contiene el gen HO en un vector centromérico, con marcador uracilo. Los transformantes se sembraron en medio sólido YNB sin uracilo, y dieron lugar a colonias en que aparecían mezcladas células  $\alpha$ ,  $\alpha$  y diploides. Cruces con las cepas testigo F4 y F5 permitieron identificar las que correspondían al talo buscado. Para permitir la pérdida del plásmido YCp-HO, los transformantes se sembraron en medio YPD y luego en placas con FoA, para asegurar la estabilidad del talo.

### 2.2.3. Técnicas generales de manipulación de Ácidos nucleicos.

#### 2.2.3.1. Aislamiento de plásmidos.

La preparación de plásmidos amplificados en *E. coli* se hizo por el método de lisis alcalina, tal como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Células de *E. coli* crecidas en medio LB a 37°C se recogieron por centrifugación y resuspendieron en un volumen adecuado de la Solución I [25 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM glucosa, 10 mM EDTA (pH 8.0)]. Se añadió 2 volúmenes de la Solución II (0.1 N NaOH, 1% SDS) recién preparada y se mezcló con suavidad. A continuación se añadió 1.5 volúmenes de la Solución III (acetato potásico 3 M) y se incubó en frío durante 10 minutos. Mediante centrifugación se separó el DNA de los restos celulares. Se concentró el DNA por precipitación con 2 volúmenes de etanol. El DNA se resuspendió en un volumen adecuado de solución TE [10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)] con una concentración de 20  $\mu$ g/mL de RNAasa A.

Para extraer plásmidos de células de levadura para su recuperación en *E. coli* se empleó el método de rotura de las células con perlas de vidrio de 425-600  $\mu$ m (G 8772, Sigma), descrito por Guthrie *et al.* (1991). Se recogieron células de 1 mL de cultivo saturado. Se resuspendieron en 200  $\mu$ L de tampón de rotura (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y se agitaron con Vórtex durante 1 minuto. Se añadieron 200  $\mu$ L fenol/cloroformo y se repitió agitación en Vórtex. Se separaron las fases por centrifugación y se pasó el sobrenadante acuoso a tubo limpio. Se purificó el DNA con



Glassmilk (Bio 101) y se resuspendió en un volumen final de 30  $\mu\text{L}$ . Se usaron 2  $\mu\text{L}$  de DNA para transformar células competentes de *E. coli*.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4.

#### 2.2.3.2. Preparación de DNA cromosómico de levaduras.

La preparación de DNA total de levaduras para amplificación por PCR o para análisis por hibridación Southern se hizo del mismo modo que el aislamiento de plásmidos, aumentando el volumen del cultivo de partida a 10 mL. El resto de las soluciones se aumentó en la misma proporción.

#### 2.2.3.3. Preparación de RNA de levadura.

El RNA de levadura se preparó por un procedimiento basado en el protocolo descrito en Ausubel *et al* (1993). Células de levadura crecidas en las condiciones adecuadas se recogieron por centrifugación en frío ( $\approx 2 \times 10^8$  células por muestra). Se resuspendieron en 1 mL tampón 0.1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 1% SDS. Se agitaron fuertemente en el Vórtex en presencia de perlas de vidrio y 1 volumen de fenol/cloroformo. Se separaron las fases por centrifugación y se pasó el sobrenadante acuoso a otro tubo. Se precipitaron los ácidos nucleicos con 3 volúmenes de etanol, se recogieron por centrifugación en el fondo del tubo y resuspendieron en 150  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  tratada con 0.1% dietil pirocarbonato (DEPC). Finalmente se precipitó el RNA con LiCl 3 M y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  tratada con 0.1% DEPC.

#### 2.2.3.4. Tratamientos enzimáticos del DNA.

Las digestiones con endonucleasas de restricción se hicieron usando los tampones y las condiciones recomendadas por los fabricantes. Se prepararon soluciones de DNA a una concentración  $\leq 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  en un volumen de 20-500  $\mu\text{L}$ , añadiendo al menos 1 U de enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA. La incubación se hizo en baño de agua a la temperatura indicada para cada enzima, durante al menos 1 hora.

#### 2.2.3.5. Clonaje de fragmentos de DNA.

El vector y el fragmento que se usó como inserto se digirieron con los enzimas adecuados para permitir el ligado. Cuando fue necesario para evitar religamiento del vector, sus extremos 5' se desfosforilaron mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP), añadida al DNA en el mismo tampón de la digestión e incubando a 37°C, 30

Tabla 4. Relación de plásmidos.

PLASMIDO	CARACTERISTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
pCAD3-2	Fragmento de ≈2.4 Kb sintetizado por PCR que contiene el gen CAD3 en vector pRS426	esta Tesis
pCAD3-6	Fragmento de ≈2.4 Kb sintetizado por PCR que contiene el gen CAD3 en vector pRS413	esta Tesis
pCA2	CNA2 en vector pIB61	esta Tesis
pCtr1	CNA2 truncado en T459 en vector pIB61	esta Tesis
pCAtr2	CNA2 truncado en M406 en vector pIB61	esta Tesis
PCATRB	CNA2 truncado en T459 y CNB1 en vector pIB61	esta Tesis
pFR70i	Promotor y regiones reguladoras de <i>ENAI</i> (-1384 a +40) en vector YIp356R	Garcíadeblás <i>et al.</i> , 1992
pGB34	Gen <i>ENAI</i> en YCp50	Garcíadeblás <i>et al.</i> , 1992
pIB61	Plásmido con el promotor y terminador del gen <i>PMAI</i> en el plásmido YEp351.	(a)
pJB1D	Disrupción <i>hog1::TRP1</i> en pRS316	(b)
pL127-6	Disrupción <i>pmr1::HIS3</i> en pBR322	(c)
pRS413	Vector Amp <sup>r</sup> , <i>CEN6</i> , <i>HIS3</i>	Sikorski (1989)
pRS423	Vector Amp <sup>r</sup> , 2μ, <i>HIS3</i>	Sikorski (1989)
pRS425	Vector Amp <sup>r</sup> , 2μ, <i>LEU2</i>	Christianson (1992)
pRS426	Vector Amp <sup>r</sup> , 2μ, <i>URA3</i>	Christianson (1992)
pSK	Vector Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pST1	Fragmento de DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> . en YEp24. Complementa al mutante SS2	Esta Tesis
YCp50	Vector Amp <sup>r</sup> , <i>ARS1</i> , <i>CEN4</i> , Tet <sup>r</sup> , <i>URA3</i>	Rose <i>et al.</i> , 1987
YCp50-HO	Gen <i>HO</i> en YCp50	(d)
pYAP4-1	<i>YAP4</i> en vector en RS426.	esta Tesis
pYAP4-3	Fragmento Hind/Xho que incluye <i>YAP4</i> , de ≈1.3 kb en pSK.	esta Tesis
pYAP4-6	Disrupción <i>Δyap4</i> , sustituyendo ≈600 pb de la zona codificante de <i>YAP4</i> por <i>HIS3</i> , en vector pSK.	esta Tesis
pYAP4-7	<i>YAP4</i> en vector pRS423.	esta Tesis
pYAP4-8	<i>YAP4</i> completo en vector en RS425R.	esta Tesis
YEp24	2μ, Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , <i>URA3</i>	Botstein <i>et al.</i> , 1979
YEp351	2μ, Amp <sup>r</sup> , <i>LEU2</i>	Hill (1993)
YEP352	2μ, Amp <sup>r</sup> , <i>URA3</i>	Hill (1993)

(a) Portillo F., Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid.

(b) Gustin M.C., Department of Biochemistry and Cell Biology, Rice University, P.O. Box 1892, Houston TX 77251 USA.

(c) Cunningham K.W., Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21218, USA.

(d) Herskowitz I., Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143-0448.

minutos. Para parar la reacción de desfosforilación se añadieron SDS y EDTA (pH 8.0) a las concentraciones finales de 0.5% y 5 mM respectivamente y se incubó a 75°C/30 minutos, como se describe en Sambrook *et al* (1989). Cuando fue necesario hacer romos los extremos protuberantes se usó el enzima T4 DNA polimerasa, usando el tampón proporcionado por el fabricante, e incubando a 37°C, 20 minutos. Para hacer el ligado entre vector e inserto se mezclaron ≈100 ng de cada DNA junto con la ligasa en un volumen de 10 µL en el tampón proporcionado por el fabricante, incubando a temperatura ambiente durante 4 horas o más. Se usaron 2-3 µL de la solución con el ligado para transformar *E. coli*.

#### 2.2.3.6. Electroforesis en geles de agarosa.

Los fragmentos de restricción procedentes de digestiones de DNA se analizaron en geles horizontales de agarosa preparados con tampón TBE 0.5x (45 mM Tris/borato, 1 mM EDTA) o TAE 1x (40 mM Tris/acetato, 1 mM EDTA), con 0.05 µg/mL de bromuro de etidio para poder visualizar las bandas a la luz UV. Se utilizó agarosa a una concentración de 0.4-1.2%, dependiendo del tamaño del DNA que se pretendía separar. La electroforesis se hizo sumergiendo el gel en el mismo tampón que se usó en su preparación. Se añadió 10% de tampón de carga (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol, 10 mM EDTA) a las muestras de DNA antes de cargar en el gel, y se fijó el voltaje a 1-10 V/cm. El tamaño y cantidad de DNA de los fragmentos de interés se estimó por comparación con los fragmentos obtenidos por digestión con el enzima de restricción HindIII, de cantidades conocidas de DNA del bacteriófago lambda.

#### 2.2.3.7. Purificación de DNA de geles de agarosa.

Para la recuperación de fragmentos de DNA del gel agarosa se usaron varias estrategias. Una de ellas se basa en la capacidad de unión del DNA a una membrana de papel DEAE-celulosa. El papel se activó previamente sumergiéndose en 10 mM EDTA, pH 8.0 durante 5 minutos, luego en 0.5 M NaOH otros 5 minutos y finalmente lavando con agua. Una tira de papel de la membrana se colocó en una ranura en el gel justo delante del fragmento de interés mientras tenía lugar la electroforesis. La membrana con el DNA adherido se lavó en tampón 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y luego se sumergió en tampón 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA para recuperar el DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Otro método consistió en abrir un pocillo con ayuda de un bisturí delante de la banda a purificar. Este pocillo se llenó con 300-450 µL de una solución 15% PEG 8000, TAE 1x y 0.5 µg/mL bromuro de etidio. Se continuó la electroforesis hasta que todo el DNA pasó al pocillo. Entonces se recogió con una pipeta y se trató con métodos convencionales de purificación: extracción con fenol/cloroformo y precipitación con acetato

sódico a una concentración de 0.3 M, y 2 volúmenes de etanol (Zhen *et al.*, 1993). Otro método consistió en recortar la banda de interés y purificar el DNA con el kit GeneClean (de BIO 101 Inc.) o con el kit Agarose Gel DNA extraction (Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones suministradas por los fabricantes.

#### 2.2.3.8. Hibridación de ácidos nucleicos.

Para hibridaciones DNA/DNA (Southern), 1-5  $\mu\text{g}$  de DNA genómico de levadura se digirió con los enzimas adecuados y se resolvió en un gel de agarosa. Se trató primero el gel con solución HCl 0.2 M durante 10 minutos para fragmentar el DNA de alto peso molecular, luego con solución de desnaturalización 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH durante 20 minutos 2 veces, y finalmente con la solución de neutralización Tris 0.5 M (pH 7.4), 1.5 M NaCl, otros 20 minutos. La transferencia del DNA del gel a membrana de nylon Hybond-N se hizo por capilaridad usando como tampón SSCx10 (NaCl 1.5 M, 0.15 M citrato sódico) tal como se describe en Sambrook *et al.* (1989). La fijación del DNA a la membrana se hizo por exposición a luz UV durante 3 minutos. La membrana se prehibridó en solución SSCx5, Denhart 5x, 0.1 % SDS, 50 mM Tris (pH 7.4) y 50 % formamida durante 2 horas. Luego se hibridó en la misma solución conteniendo la sonda durante 24 horas a 42°C. Se lavó la membrana 2 veces en SSCx2, 0.1%SDS y 2 veces en SSCx0.2, 0.1%SDS. Cada lavado se hizo a 45°C durante 15 minutos. Finalmente la membrana se expuso en película autorradiográfica durante 24-48 horas a -70°C usando pantallas intensificadoras. La sonda radiactiva se preparó con 0.25-1  $\mu\text{g}$  de fragmento de DNA. Para hacer el marcaje se utilizaron los kit Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) o Ready to Go (Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones suministradas por los fabricantes. Los oligonucleótidos no incorporados se separaron mediante cromatografía en una columna de Sephadex G-50. La sonda se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 5 minutos previo a su uso.

Las hibridaciones RNA/DNA (northern) se realizaron con RNA total (5-15  $\mu\text{g}$ ) de levadura resuelto en gel de agarosa en tampón MOPS (20 mM MOPS, 8 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 7.0) y en presencia de 1.1% formaldehído. El gel se lavó tres veces en SSCx2. La transferencia del RNA del gel a membrana de nylon se hizo por capilaridad en SSCx10. Después de la transferencia la membrana se lavó brevemente en SSCx5. Las condiciones de fijación del RNA a la membrana, hibridación, lavados, fueron similares a los usados para DNA.

### 2.2.3.9. Amplificación por PCR de fragmentos de DNA.

Para cada reacción se utilizaron  $\approx 100$  ng de DNA,  $0.25 \mu\text{M}$  de cada oligo,  $0.2 \text{ M}$  dNTP (dATP+dCTP+dGTP+dTTP, de Boehringer Mannheim),  $1.5\text{-}2.5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  y  $0.5\text{-}1 \text{ U}$  de Taq I DNA polimerasa en un volumen de  $50$  ó  $100 \mu\text{L}$ . En general se usaron las siguientes condiciones de reacción:  $4$  minutos a  $98^\circ\text{C}$  para desnaturalizar el DNA, añadiendo al final el enzima Taq I DNA polimerasa,  $25$  ó  $30$  ciclos con la secuencia:  $1$  minuto a  $94^\circ\text{C}$ ,  $1$  minuto a  $40\text{-}50^\circ\text{C}$ ,  $3$  minutos +  $5$  seg/ciclo a  $72^\circ\text{C}$ , para la síntesis de DNA, y finalmente  $10$  minutos a  $72^\circ\text{C}$  para la extensión final.

### 2.2.4. Transformación de células.

#### 2.2.4.1. Transformación de *E. coli*.

La transformación de *E. coli* se hizo según el protocolo descrito por Hanahan *et al.* (1985). Se usaron células competentes de la estirpe DH5 $\alpha$  ó XL1-Blue. Las células se crecieron en medio LB o medio  $\psi$  hasta  $\text{DO}_{550}=0.5$ . Se recogieron las células en frío y se resuspendieron en la solución TFB1 ( $10 \text{ mM}$  RbCl,  $50 \text{ mM}$  MnCl $_2$ ,  $30 \text{ mM}$  KOAc,  $10 \text{ mM}$  CaCl $_2$ ,  $15\%$  Glicerol). Se incubaron en hielo  $15$  minutos y se volvieron a recoger por centrifugación en frío. Finalmente se resuspendieron en solución TFB2 ( $10 \text{ mM}$  MOPS,  $10 \text{ mM}$  RbCl,  $75 \text{ mM}$  CaCl $_2$ ,  $15\%$  glicerol) frío. Se usaron alícuotas de  $100\text{-}200 \mu\text{L}$  de células para transformar con  $10\text{-}100$  ng de DNA (plásmidos con el gen de resistencia a ampicilina). Las células con el DNA se incubaron primero en hielo por  $20$  minutos, y luego se sometieron a un choque térmico de  $42^\circ\text{C}$  durante  $90$  segundos. Se les añadió medio LB ó  $\psi$  y se incubaron  $30\text{-}60$  minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se recogieron por centrifugación a baja velocidad y se extendieron en placas LB con  $50 \text{ mg/L}$  de ampicilina para la seleccionar los transformantes. Cuando era posible identificar plásmidos recombinantes por inactivación del enzima  $\beta$ -galactosidasa, se extendieron  $4 \mu\text{L}$  de IPTG ( $200 \text{ mg/mL}$ ) y  $40 \mu\text{L}$  X-Gal ( $20 \text{ mg/mL}$ ) sobre la superficie de la placa previamente a la siembra de bacterias.

#### 2.2.4.2. Transformación de *S. cerevisiae*.

Se usaron dos métodos para transformar *S. cerevisiae*: electroporación o por tratamiento con acetato de litio. Para la electroporación las células se someten a un pulso eléctrico de  $1.500$  voltios que permite la entrada de DNA. Se utilizó el protocolo suministrado por el fabricante del electroporador Bio-Rad. Las células se crecieron en  $80 \text{ mL}$  de medio líquido hasta  $\text{DO}_{600}=0.8\text{-}1$ . Se recogieron por centrifugación, se lavaron en agua estéril fría dos veces y se resuspendieron en  $5 \text{ mL}$  de sorbitol  $1 \text{ M}$ . Se añadieron  $\approx 100$  ng de DNA en un volumen  $\leq 5 \mu\text{L}$  a alícuotas de  $50 \mu\text{L}$  de células que se pasaron a una cubeta de

electroporación con 0.2 cm de luz para ser sometidas a un pulso eléctrico de 1.5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . Se les añadió 1 mL de sorbitol 1 M inmediatamente después del pulso y se extendieron las células en placas selectivas.

Transformación usando acetato de litio, basado en el método desarrollado por Ito *et al.* (1983), por el que las células de levadura se hacen competentes para tomar DNA en presencia de cationes alcalinos, en especial litio. Células crecidas en cultivo líquido o tomadas directamente de una placa de Petri se resuspendieron en 0.5-1 mL de una solución 0.1 M acetato de litio, 10 mM Tris-ClH, pH 8.0, 1 mM EDTA. Se recogieron por centrifugación y se retiró todo el líquido. Se añadió 1  $\mu$ g de DNA para transformar las células y 50  $\mu$ g de DNA de salmón para aumentar la eficiencia de transformación. Se incubaron en una solución 40% PEG 4000, 0.1 M acetato de litio, 10 mM Tris-ClH, pH 8.0, 1 mM EDTA, durante 15 minutos a 42°C como se describe en Ausubel *et al.* (1996), o bien a temperatura ambiente durante 8-24 horas como describe Elble *et al.* (1992). La siembra de células en placas selectivas se hizo bien mediante asa esterilizada al calor o con bolas de vidrio (4 mm  $\phi$ ) estériles.

#### 2.2.5. Mutagenesis de levadura con EMS.

La estirpe GRF167-b (*MAT $\alpha$* , *ura3*, *his3*, *GAL<sup>+</sup>*) de *S. cerevisiae* fue seleccionada para la obtención de mutantes sensibles a NaCl debido a su baja tolerancia a NaCl comparada a otras estirpes disponibles en el laboratorio. El mutágeno utilizado fue el agente alquilante etil metano sulfonato (EMS), que produce sustituciones de bases, especialmente transiciones en sitios G:C. La mutagénesis se hizo como se describe en Guthrie y Fink (1991). Se recogieron por centrifugación  $\approx 10^8$  células crecidas en medio líquido YPD a  $DO_{600} \approx 0.7$ , y se resuspendieron en 10 mL de tampón 50 mM fosfato potásico (pH 7.0). Se repitió la operación para lavar las células, que finalmente se resuspendieron en 2 mL del mismo tampón. Se añadió 60  $\mu$ L de solución EMS (M0880, Sigma) y se incubó a 30°C durante 30 minutos con agitación. Para parar la mutagénesis se añadió 2 mL de tiosulfato sódico 10% (p/v). Para calcular el porcentaje de supervivencia se tomaron muestras de las células antes y después del tratamiento con EMS y se extendieron en placas con medio sólido YPD.

#### 2.2.6. Determinación de la tolerancia a inhibidores del crecimiento.

Las medidas de tolerancia a sales, osmolitos y otros inhibidores del crecimiento se realizaron por siembra medio sólido, determinándose la capacidad de formación de colonias. Para obtener estimaciones cuantitativas de tolerancia, se midió la capacidad de crecimiento en medio líquido suplementado con distintas concentraciones del inhibidor.

### 2.2.6.1. Ensayos en cultivos líquidos.

Para la medir velocidad de crecimiento se prepararon varios cultivos de células a una  $DO_{600}$  inicial de 0.1 en 10 ml de medio suplementado con distintas concentraciones del inhibidor más una muestra sin inhibidor como control. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación y cada 3-4 horas se tomaron alícuotas para medir la densidad de células hasta que el crecimiento se hacía estacionario. Se definió la concentración inhibitoria  $IC_{50}$  como la concentración de inhibidor que redujo la velocidad de crecimiento a un 50% comparado con el crecimiento en el medio sin inhibidor. Alternativamente se prepararon cultivos en 1-2 ml de medio suplementado con distintas concentraciones del inhibidor más una muestra sin inhibidor a una  $DO_{600}$  inicial de 0.01 y se dejaron crecer a 30°C durante  $\approx 24$  horas. Pasado ese tiempo se midieron las densidades ópticas de todos los cultivos. En este caso la concentración inhibitoria  $IC_{50}$  se definió como la concentración de inhibidor que redujo la densidad del cultivo a un 50% respecto de la densidad del cultivo control sin inhibidor.

### 2.2.6.2. Ensayos en medios sólidos.

La tolerancia de las células a distintas concentraciones de inhibidor en medios de cultivo sólidos se determinó por la capacidad de formar colonias. En algunos casos se utilizó el método de goteo. Se prepararon cultivos de células a una  $DO_{600} \approx 1.0$ . A partir de estos cultivos se hicieron 3 ó 4 diluciones seriadas de 1:50 ó 1:100 y se sembraron gotas de 2.5  $\mu$ l de cada una de ellas en placas suplementadas con el inhibidor más una placa control sin inhibidor.

### 2.2.7. Ensayos de la actividad $\beta$ -galactosidasa.

Estos ensayos se realizaron según se describe en Guthrie y Fink (1991) y Ausubel *et al.* (1996). La actividad del enzima se mide por la hidrólisis del sustrato cromogénico O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosa (ONPG, de Boehringer Mannheim), que da como productos finales galactosa y O-nitrofenol. Este último es un compuesto amarillento que puede detectarse por su absorción a 420 nm.

Para ver inducción del gen *ENAI* se usaron dos plásmidos procedentes del laboratorio del Dr. Rodríguez Navarro: pFR70, un plásmido episómico multicopia, y pFR70i, un plásmido de tipo integrativo. Ambos plásmidos contienen el contienen *URA3* como marcador selectivo y una construcción *ENAI::LacZ* en la que el promotor del gen *ENAI* y los primeros aminoácidos de la proteína Ena1 se han fusionado en fase al gen *LacZ* bacteriano que codifica para el enzima  $\beta$ -galactosidasa (Garcia de Blas *et al.*, 1992). Cuando se usó el plásmido pFR70i, éste se digirió previamente con la endonucleasa de restricción

NcoI, que corta de manera única dentro del marcador *URA3*, para dirigir la integración del plásmido al locus *URA3* cromosómico.

Células de levadura transformadas con la fusión *ENAI::LacZ* se crecieron en cultivo líquido a  $DO_{600} \approx 1.0$ . Para la inducción de *ENAI* se incubaron por 30 minutos o más en medio con NaCl, LiCl ó pH 8.0. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en Tampón Z (60 mM  $Na_2HPO_4$ , 40 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7.0). Se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF, Sigma) a una concentración final de 10 mM para estabilizar las proteínas. Para el ensayo se usaron alícuotas de 1 mL con  $1-3 \times 10^6$  células a las que se añadió  $\approx 15 \mu L$  de cloroformo para permeabilizar la membrana. Las células se incubaron a  $30^\circ C$  y se les añadió 200  $\mu L$  de O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosa (ONPG) 4 mg/mL. Cuando se desarrolló suficiente color amarillo se paró la reacción con 500  $\mu L$  de  $Na_2CO_3$ , se centrifugaron las muestras para depositar en el fondo las células y se midió la absorción del sobrenadante a 420 nm. Se calculó la actividad  $\beta$ -galactosidasa mediante la fórmula de Miller (1972):

$$U = \frac{(1000) \times (DO_{420})}{(t) \times (v) \times (DO_{600})}$$

donde  $DO_{420}$  es la absorbancia debida a ONPG;  $DO_{600}$ , la densidad de células antes del ensayo; t es el tiempo de reacción en minutos y v el volumen de cultivo usado en el ensayo.

Alternativamente, las células se resuspendieron en 100-200  $\mu L$  de tampón de rotura [100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM DTT] y se rompieron con perlas de vidrio (425-600  $\mu m$ , Sigma) mediante agitación en el Vórtex a velocidad máxima. El extracto proteico se separó de los restos celulares y perlas de vidrio por centrifugación. La concentración de proteínas se calculó según el método descrito por Bradford (1976) usando reactivo de BioRad. Para el ensayo se usaron 20 ó 40  $\mu g$  de proteína en 1 mL de Tampón Z y 200  $\mu L$  de ONPG (4 mg/mL) y se incubaron a  $30^\circ C$  hasta que apareció el color amarillo. Se paró la reacción con 500  $\mu L$  de  $Na_2CO_3$ . La actividad  $\beta$ -galactosidasa se calculó por la fórmula:

$$U = \frac{(1000) \times (DO_{420})}{(t) \times (m)}$$

Siendo  $DO_{420}$  la absorbancia debida a ONPG; t, el tiempo de reacción en minutos; y m, la cantidad de proteína en mg.



### 2.2.8. Cinética de acumulación de cationes en células de *S. cerevisiae*.

Las velocidades iniciales de transporte y la acumulación o la pérdida de cationes respecto al tiempo se determinaron mediante el análisis del contenido de cationes en la célula. Este ensayo se utilizó para medir contenido de  $\text{Li}^+$  y  $\text{Cd}^+$ , siguiendo el procedimiento descrito por Camacho *et al.* (1981). Las células se inocularon en los medios de cultivo adecuados en cada caso, y se dejaron crecer hasta  $\text{DO}_{600}$  0.2-0.3 si se trataba de medio AP ó hasta  $\text{DO}_{600} \geq 1.0$  en medio rico YPD. Tras la adición del catión se recogieron células a intervalos regulares filtrando un volumen (5-10 ml) de cultivo en filtros (Millipore AAWP de 0.8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) conectados a una bomba de vacío. Los filtros con células se lavaron 3 ó 4 veces con una solución 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Cuando era necesario las células se transfirieron a otro filtro y se volvieron a lavar. Para extraer los cationes celulares, los filtros se incubaron en tubos con 5 ml de una solución 0.2 M HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  durante 6-12 horas. Posteriormente los tubos se centrifugaron y se analizaron los cationes en un espectrofotómetro de absorción atómica

### 2.2.9. Métodos de Fluorescencia microscópica.

#### 2.2.9.1. Tinción de la quitina de la pared celular.

Para visualizar las deposiciones de quitina en la pared celular de *S. cerevisiae* se utilizó el colorante blanco calcoflúor M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma). Las células de levadura se fijaron añadiendo formaldehído a una concentración final de 3.7-5% e incubando 5-30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 100-500  $\mu\text{L}$  de células, se lavaron una vez con 1 mL de agua y se resuspendieron en 50-100  $\mu\text{L}$  de una solución de 1 mg/mL de calcoflúor. Se incubaron a temperatura ambiente 5-30 minutos. Se volvieron a lavar con agua antes de observar al microscopio usando iluminación UV con los filtros adecuados: filtro de excitación de 340-365 nm y de emisión de 440 nm (Pringle *et al.*, 1989).

#### 2.2.9.2. Tinción del núcleo.

Para observar el núcleo se fijaron las células en 70% etanol. Después de  $\approx 30$  minutos, las células se lavaron una vez con agua y se resuspendieron en una solución 0.1-0.5  $\mu\text{g/mL}$  4', 6-Diamidino-2-phenylindole  $\cdot$  2 HCl (DAPI) en agua. Las células se lavaron antes de su observación al microscopio usando iluminación UV con los filtros adecuados: filtro de excitación de 340-365 nm y de emisión de 450-488 nm (Pringle *et al.*, 1989).

### 3. RESULTADOS

Previamente a la búsqueda de mutantes se seleccionó la estirpe GRF167 por su mayor sensibilidad relativa a NaCl.

#### 3.1. Aislamiento de mutantes de levadura sensibles a NaCl.

Con el objeto de identificar genes y proteínas necesarios para la adaptación celular de *S. cerevisiae* a condiciones de alta salinidad, se aislaron y caracterizaron mutantes hipersensibles a NaCl. Células de la estirpe GRF167-b (*MAT $\alpha$* , *ura3*, *his3*, *GAL*<sup>+</sup>) se mutagenizaron con etil-metano-sulfonato (EMS) como se describe en Materiales y Métodos, y se sembraron en medio sólido YPD para obtener colonias aisladas. El porcentaje de supervivencia al tratamiento con EMS fue de 60%. Se analizaron 8.100 de estos supervivientes y se seleccionaron 22 mutantes hipersensibles a NaCl. El criterio selectivo fue la incapacidad de crecer en medio sólido YPD (pH 7.0) suplementado con 0.7 M de NaCl, una concentración salina que retarda pero no impide el crecimiento de células silvestres. Sin embargo, una mayor sensibilidad a NaCl no es evidencia suficiente de que se haya producido una mutación en un gen involucrado específicamente en la adaptación celular a una alta concentración salina. En *S. cerevisiae*, al igual que en otros organismos, existe solapamiento entre las respuestas fisiológicas a varios tipos de estrés. Diferentes factores externos que afectan al crecimiento normal de la célula pueden provocar respuestas moleculares comunes que posibilitan la adquisición de resistencia general a estrés. Así por ejemplo, el pretratamiento de células con un choque osmótico moderado confiere resistencia a un choque térmico subsiguiente. Igualmente, la exposición de levaduras a altas concentraciones de etanol o de ácidos débiles da lugar a termotolerancia (Mager y De Kruijff, 1995; Hohmann y Mager, 1997). Considerando que el grado de termotolerancia es una característica fenotípica frecuentemente asociada con la respuesta general a estrés, los mutantes seleccionados en un primer escrutinio se transfirieron a medio YPD con y sin 0.7 M NaCl, y se incubaron a 37°C, una temperatura que supone un estrés térmico para *S. cerevisiae*, y a 23°C como control (Figura 4). De los 22 mutantes sensibles a NaCl, 7 eran además termosensibles (categoría TS) que no crecieron a 37°C en ausencia de sal. Cuatro mutantes presentaron un fenotipo condicional, sensibles a NaCl a 23°C pero tolerantes a 37°C (SC). Los otros 11 mutantes mostraron una sensibilidad a NaCl específica e incondicional (mutantes SS), y fueron seleccionados para un análisis más detallado.

Para cuantificar el grado de sensibilidad a NaCl, se comparó el crecimiento de los mutantes SS y la estirpe parental GRF167 en medio líquido YPD suplementado con concentraciones crecientes de NaCl. Se estimó la concentración de NaCl que redujo la velocidad de crecimiento en un 50% en relación al medio sin sal. En adelante a esta concentración

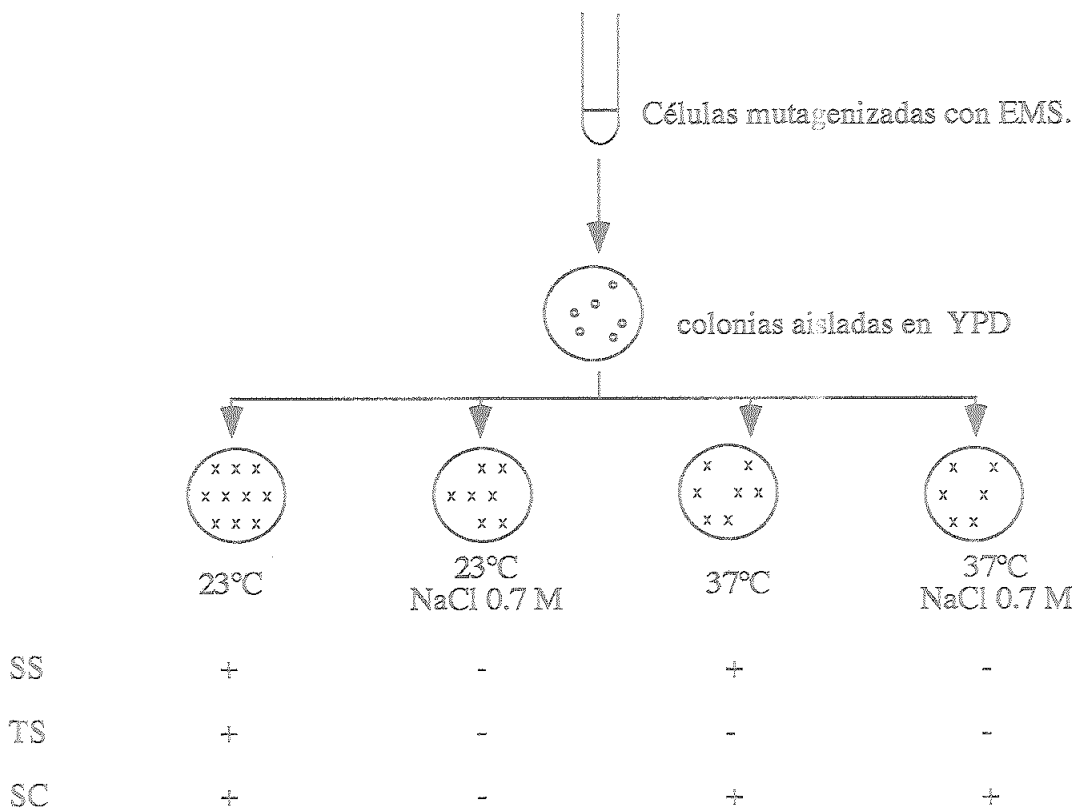


Figura 4. Selección de mutantes sensibles a NaCl. Células de la estirpe GRF167 supervivientes a la mutagénesis con EMS se sometieron a cuatro condiciones de crecimiento en medio sólido YPD: 23°C, 23°C / 0.7 M NaCl, 37°C, y 37°C / 0.7 M NaCl. Se seleccionaron aquellos mutantes incapaces de crecer en medio salino a 23°C ó 37°C (mutantes SS). Se descartaron aquéllos que fueron incapaces de crecer a 37°C (mutantes TS) o cuya sensibilidad a NaCl desaparecía a 37°C (SC).

inhibitoria se le denominará  $IC_{50}$ . El efecto inhibitorio del NaCl tiene al menos dos efectos diferenciados sobre la célula: por un lado, la alta tonicidad del medio supone un estrés osmótico, y por otro, se produce una toxicidad iónica debida a la excesiva acumulación intracelular de iones. Para esclarecer cuál de estos componentes limitaba el crecimiento de los mutantes SS se midió también la concentración inhibitoria  $IC_{50}$  para las sales LiCl y KCl. El ión  $Li^+$  es un análogo tóxico del  $Na^+$  que utiliza los mismos mecanismos de transporte de entrada y salida de la célula. En *Schyzosaccharomyce pombe* el ion  $Li^+$  es aproximadamente 10 veces más tóxico que el  $Na^+$  a una misma concentración molar (Jia *et al.*, 1992). Una relación semejante (15 veces más tóxico) se ha encontrado para *S. cerevisiae* (Figura 5). Por el contrario, el ión  $K^+$  es menos tóxico que el  $Na^+$  y sólo inhibe el crecimiento a concentraciones mayores que someten a la célula a un elevado estrés osmótico (Figura 5). También se utilizó etilenglicol a una concentración final de 2M como agente osmoactivo no iónico (Singh y Sherman, 1978). En la Figura 5 se muestra el efecto inhibitorio de NaCl, KCl y LiCl sobre el crecimiento de los mutantes SS2 y SS10 comparados con el silvestre GRF167. El valor de  $IC_{50}$  para NaCl fue de 0.1 M para los mutantes SS2 y SS10, aproximadamente 5 veces menor que el valor de  $IC_{50}$  para la cepa silvestre (0.47 M NaCl). Ambos mutantes eran también bastante más sensibles a LiCl ( $IC_{50} \approx 7.7$  mM para SS2 y 15 mM para SS10) que el parental GRF167 ( $IC_{50} \approx 29$  mM LiCl), mientras que la sensibilidad a KCl era similar para las tres estirpes ( $IC_{50} \approx 1.3$  M KCl). Estos resultados indican que SS2 y SS10 son específicamente sensibles al efecto tóxico de  $Na^+$  y  $Li^+$  pero no son hipersensibles al estrés osmótico. Se realizaron experimentos similares con los otros mutantes SS. En la Tabla 5 se indican los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para NaCl y LiCl, así como la capacidad de crecimiento en medio suplementado con 1.5 M KCl ó 2 M etilenglicol.

### 3.1.1. Análisis genético de los mutantes SS.

Para comprobar el carácter dominante o recesivo de las mutaciones causantes de hipersensibilidad a sal en los mutantes SS, se obtuvieron diploides heterocigotos por cruzamiento con la estirpe parental. También se cruzaron los mutantes entre sí para establecer grupos de complementación y determinar si las mutaciones afectaban a genes distintos. El fenotipo de tolerancia a NaCl demostrado por los diploides obtenidos, excepto en cruzamientos entre mutantes idénticos, indicó que todas las mutaciones seleccionadas eran recesivas y afectaban a genes diferentes (Tabla 6).

### 3.1.2. Estudio del mutante SS2.

El mutante SS2 mostró la máxima sensibilidad a sodio y litio de entre todos los mutantes aislados y fue seleccionado para un exámen detallado. Para comprobar el carácter

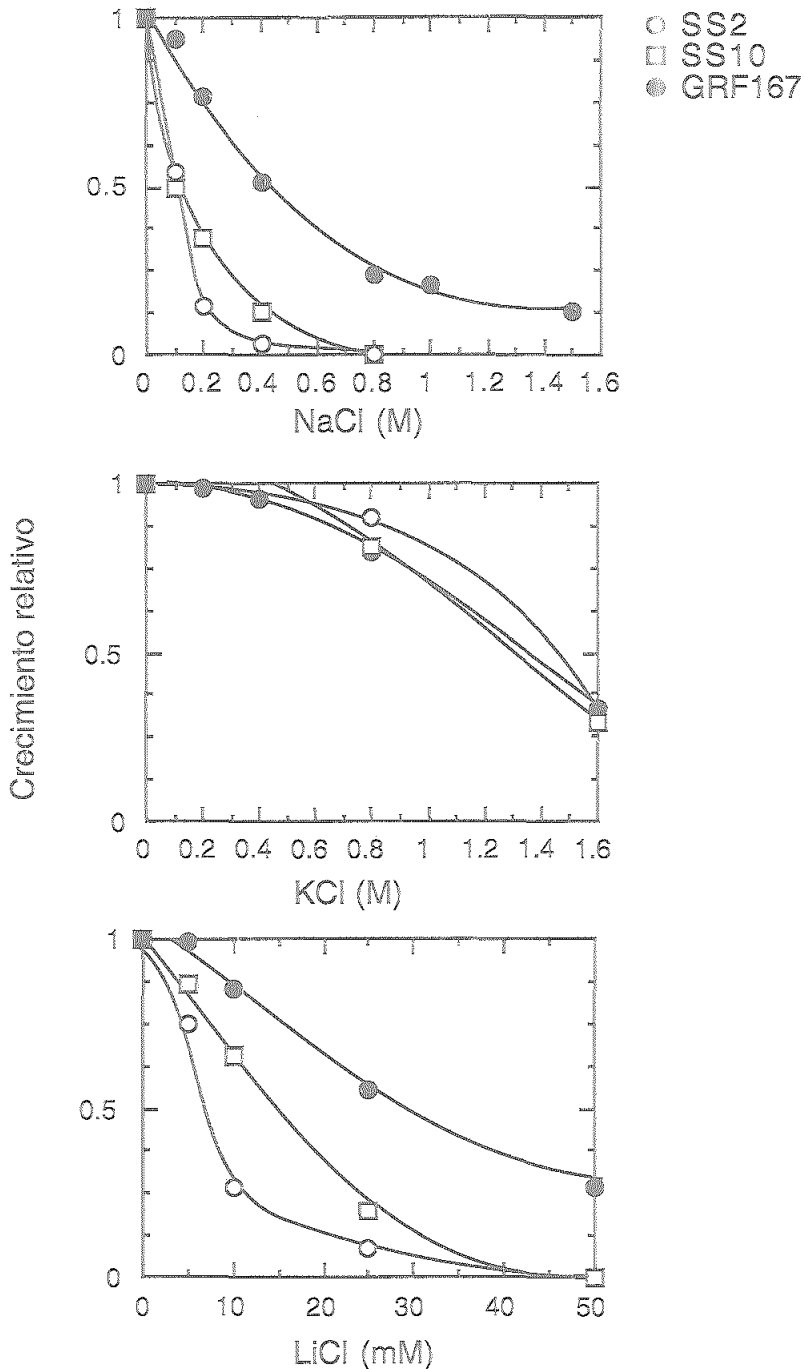


Figura 5. Inhibición del crecimiento de los mutantes SS2, SS10 y silvestre GRF167 por NaCl, KCl y LiCl. Células de los mutante SS2, SS10 y silvestre GRF167 se crecieron en medio líquido YPD suplementado con distintas concentraciones de NaCl, KCl y LiCl (abscisas). Se hizo un seguimiento del crecimiento de los cultivos mediante mediciones de la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) a intervalos regulares. En ordenadas se indica la relación entre la velocidad de crecimiento en los medios con NaCl, KCl y LiCl y el crecimiento en medio sin sal. La concentración inhibitoria  $IC_{50}$  es la concentración de sal necesaria para reducir la velocidad de crecimiento de las células a un 50% en relación con el crecimiento del control.

Tabla 5. Relación de mutantes sensibles a sal.

ESTIRPE	0.7 M NaCl	1.5 M KCl	2 M E.G.	NaCl [M]	LiCl [mM]
GRF167	+	+	+	0.47	29
SS2	-	+	+	0.11	7.7
SS10	-	+	+	0.10	15
SS13	-	+	+	0.20	20
SS19	-	+	+	0.20	8.7
SS20	-	+	+	0.27	nd
SS21	-	+	+	0.20	5.5
SS1	-	-	-	0.33	nd
SS11	-	-	-	0.33	nd
SS3	-	-	-	0.19	nd
SS4	-	-	-	0.20	nd
SS15	-	+	-	0.27	nd

(+) indica crecimiento (-) no crecimiento en medio sólido YPD suplementado con 0.7M NaCl, 1.5 M KCl y 2M Etilen glicol (E.G.). Las dos últimas columnas corresponden a las concentraciones inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de NaCl y LiCl. nd significa no determinado.

Tabla 6. Establecimiento de grupos de complementación.

	wt	SS2	SS10	SS13	SS19	SS20	SS21	SS1	SS11	SS3	SS4	SS15
wt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SS10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SS13	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SS19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SS20	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SS21	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SS1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
SS11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SS3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SS4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SS15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Los símbolos + y - representan crecimiento o no en medio sólido YPD suplementado con 0.7 M NaCl del diploide resultante de cruzar todos los mutantes entre sí o con el silvestre.

monogénico de la mutación presente en la estirpe SS2, se cruzaron células de dicho mutante con células la estirpe silvestre JP1. El diploide resultante (JP3) produjo pocas ascas en los medios de esporulación ensayados. Además, las esporas diseccionadas por micromanipulación y sembradas individualmente resultaron poco viables. De 6 tetradas disectadas sólo germinaron 19 esporas, de las cuales 10 eran sensibles a NaCl y 9 eran tolerantes. Esta segregación 1:1 indicó que la mutación presente en la estirpe sensible SS2 afecta a un sólo gen, que se denominó *nls1* (de sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>).

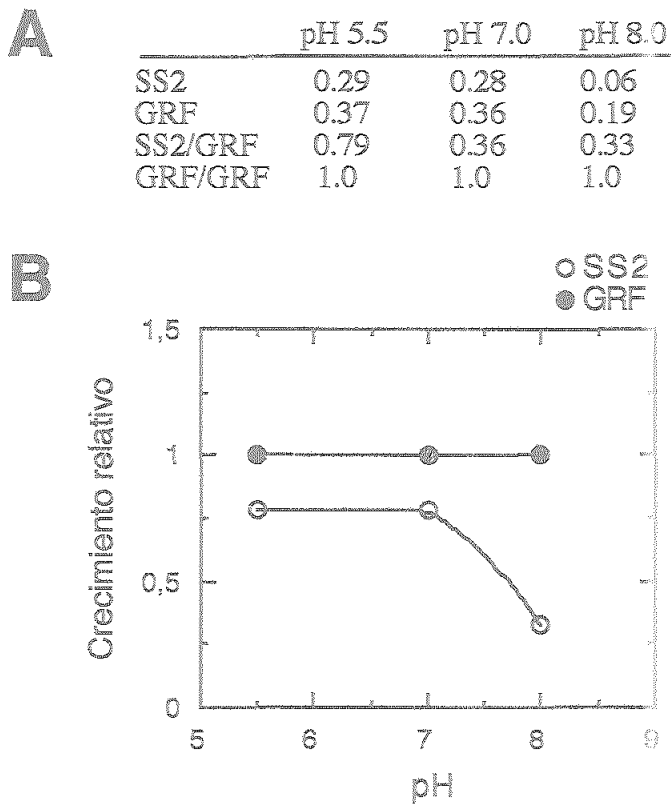
Un mutante *nls1* es específicamente sensible a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>, pero no osmosensible. La resistencia de *S. cerevisiae* a los iones Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> depende en gran medida de la actividad de las ATPasas codificadas por los genes *ENA*. De ellos, el gen *ENA1* es el que más contribuye a la tolerancia celular. Los mutantes *enal* son sensibles a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>, y también a pH alcalino (Garcíadeblas *et al.*, 1993). Para ver si la mutación *nls1* producía sensibilidad a pH alcalino se hicieron mediciones del crecimiento de este mutante en medio líquido tamponado a distintos valores de pH (5.5, 7.0 y 8.0). Como puede verse en la Figura 6, el crecimiento del mutante *nls1* a pH 8.0 se redujo 2,6 veces comparado con el crecimiento del silvestre. El fenotipo de sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> de un mutante *enal* se debe a que en ausencia de la ATPasa *ENA1* el flujo de salida de estos iones al exterior se ve muy disminuído (Haro *et al.*, 1991). Para comprobar si la sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> del mutante SS2 se debía así mismo a defectos en la salida de esos iones, se hicieron medidas de acumulación de Li<sup>+</sup> en células mutantes *nls1* y células silvestres. Como puede verse en la Figura 7, después de 30 minutos, las células *nls1* claramente acumularon más Li<sup>+</sup> que las células control.

La coincidencia de fenotipos de los mutantes *nls1* y *enal* sugería que el gen mutado en SS2 fuera *ENA1*. Para comprobar esta posibilidad se cruzó la estirpe JP3-5b (*MATa, nls1*) con la estirpe RHW21a (*MAT $\alpha$ ,  $\Delta$ (*enal-4*)::LEU2*). La tolerancia a sal (medio sólido YPD con NaCl 1M) del diploide era similar a la del silvestre, indicando que ambas mutaciones no eran alélicas (Figura 8). Además el gen *ENA1* clonado en un plásmido monocopia (pGB34, Tabla 4), no recuperó el crecimiento de SS2 en medio sólido YPD con 0.7 M NaCl, sugiriendo de nuevo que la mutación *nls1* no correspondía al gen *ENA1* a pesar de la coincidencia en los fenotipos.

### 3.2. Aislamiento del gen *CNBI*.

Para identificar el gen mutado en SS2 (*nls1*) se transformaron células de este mutante con una genoteca de fragmentos de DNA de *S. cerevisiae* construída en el vector multicopia YE<sub>p</sub>24. De los 7870 transformantes URA<sup>+</sup> obtenidos, sólo uno mostró un crecimiento similar al silvestre GRF167 en medio sólido YNB con 1 M NaCl. Se aisló el plásmido (pST1) que contenía este transformante tolerante y se amplificó en *E. coli*. Se transformó la





**Figura 6. Inhibición por pH alcalino del crecimiento de SS2.** Se prepararon cultivos con el mutantes SS2 y el silvestre GRF167 en medio líquido YPD con pH ajustado a tres valores: 5.5, 7.0 y 8.0. (A) Se estimó la velocidad de crecimiento en cada uno de los medios, y se normalizó para la velocidad de crecimiento del silvestre GRF167. (B) Representación gráfica de los crecimientos relativos.

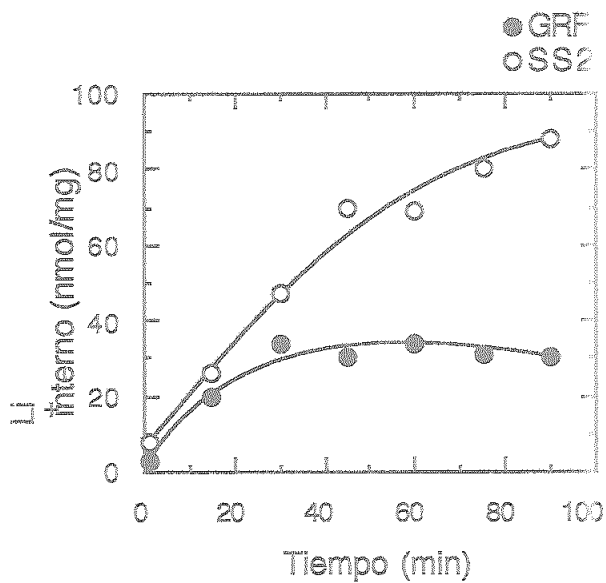
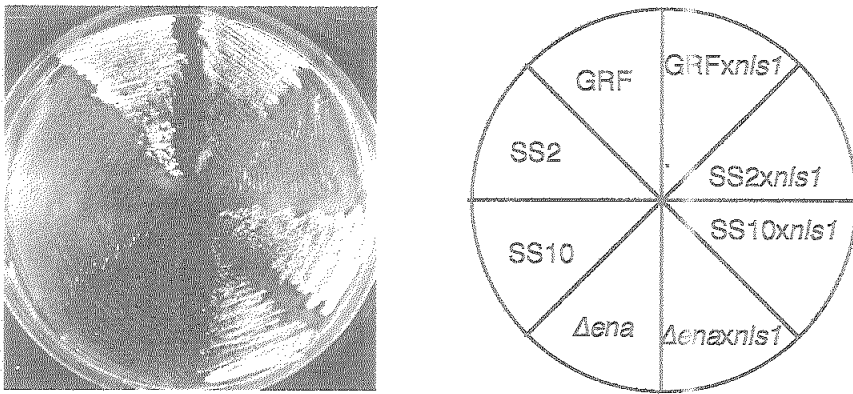


Figura 7. Acumulación de litio en las estirpes SS2 y GRF167. Células de la estirpe silvestre GRF167 y mutante SS2 se incubaron en medio AP suplementado con 1 mM KCl y 30 mM LiCl. Se tomaron muestras a los tiempos indicados, las células se recogieron por filtración y se determinó el contenido intracelular de litio por espectrofotometría de absorción atómica. Los valores se normalizaron respecto al peso seco de la muestra de células.



**Figura 8.** La mutación *nls1* no es alélica a *ena1*. La estirpe IP3-5b (*nls1*) se cruzó con el silvestre GRF167, RHW21α ( $\Delta ena1-4$ ), SS10 (*nls2*) y SS2 (*nls1*). Los diploides resultantes y sus parentales se sembraron en medio YPD suplementado con 1 M NaCl. La placa se incubó durante 6 días a 30°C. El crecimiento en medio YPD sin sal era similar en todas las muestras.

estirpe SS2 con pST1 y se comprobó la tolerancia a sal de varios transformantes independientes. Todos ellos resultaron ser tolerantes, indicando que el fragmento de DNA contenido en pST1 era responsable de la supresión fenotípica. Mediante análisis con enzimas de restricción se comprobó que pST1 contenía un inserto de 8.2 kb. Usando distintos enzimas de restricción, este inserto se dividió en varios fragmentos que se subclonaron en el vector YEp24, obteniéndose nuevos plásmidos que se usaron para transformar SS2 y ensayar su capacidad para recuperar la tolerancia a NaCl 0,7 M (Figura 9). De este modo se acotó una región BamHI-BglIII de 2.5 kb, capaz de complementar la mutación *nls1*. Un fragmento BamHI de 3,25 kb conteniendo la región anterior, e introducido en el vector centromérico YCp50 devolvía a SS2 la tolerancia a NaCl a niveles semejantes al silvestre, indicando que el gen contenido en este fragmento no era un supresor de la mutación *nls1*.

La secuencia obtenida de ambas cadenas del fragmento BamHI-BglIII de 2,5 kb coincidió con 4 genes inscritos en los bancos de datos GenBank y EMBL: *DPH2* (necesario para la biosíntesis de diftamida), *CNBI* (que codifica para la subunidad reguladora de calcineurina, una proteína-fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ ), *HYM1* y *PAX2*. Puesto que el fragmento BamHI-BglIII de 2,5 kb contenía sólo un 52% de la región codificante de *DPH2*, era improbable que fuera este gen el responsable de la complementación, y sugería que *CNBI* complementaba la mutación *nls1*.

Para comprobar que *CNBI* era el gen afectado en el mutante SS2, se construyó un alelo nulo ( $\Delta cnb1::HIS3$ ) sustituyendo el fragmento interno BstXI de 544 pb por el gen *HIS3* (Figura 10), que se utilizó para inactivar el gen *CNBI* en la cepa silvestre GRF167. La disrupción del gen *CNBI* con el fragmento *cnb1::HIS3* se comprobó mediante análisis de Southern con DNA de los transformantes  $HIS^+$  obtenidos (Figura 11). La disrupción del gen *CNBI* dió lugar a sensibilidad a NaCl, aunque el disruptante  $\Delta cnb1$  era algo más tolerante ( $IC_{50} = 0.17$  M) que el mutante SS2 ( $IC_{50} = 0.1$  M). De igual manera, se obtuvieron disruptantes  $\Delta cnb1$  en las cepas JP5-1b, DBY746, W303 y YPH499 (Tabla 2). En todos los casos la disrupción  $\Delta cnb1$  produjo mayor sensibilidad a NaCl. Por último se obtuvo un diploide mediante cruce de SS2 (*MAT $\alpha$ , nls1*) con la estirpe JP23 (*MAT $\alpha$ , cnb1::HIS3*), que resultó sensible a sal. Se analizaron siete tetradas procedentes de la esporulación de este diploide y todos los segregantes haploides fueron sensibles a NaCl. Estos resultados demuestran que la mutación *nls1* corresponde al gen *CNBI*, y que la subunidad reguladora de calcineurina es necesaria para la tolerancia a NaCl.

### 3.2.1. La proteína fosfatasa calcineurina es esencial para la tolerancia a NaCl.

Calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad reguladora y una subunidad

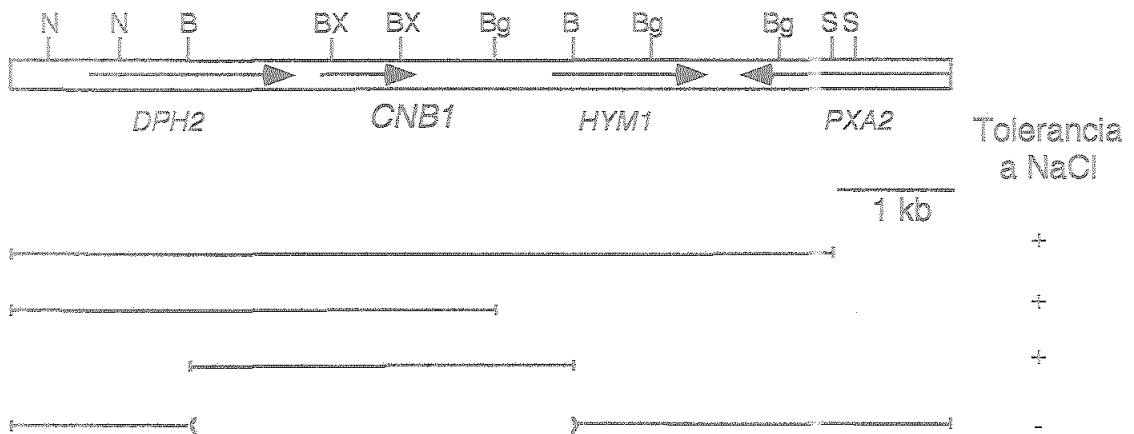


Figura 9. Mapa físico en torno al locus *CNB1* y análisis de subclones. En la parte superior se muestra la localización de las regiones codificantes de *DPH2*, *CNB1*, *HYM* y *PAX2* y sitios de restricción relevantes (Bg, BgIII; B, BamHI; N, NcoI; S, Sall; BX, BstXI). Debajo, fragmentos subclonados para identificar la región funcional que complementó la sensibilidad a NaCl de SS2, y delección BamHI. A la derecha se muestran los fenotipos en medio YNB con 0.7 M NaCl de SS2 transformado con cada uno de los fragmentos subclonados. +, tolerante; - sensible.

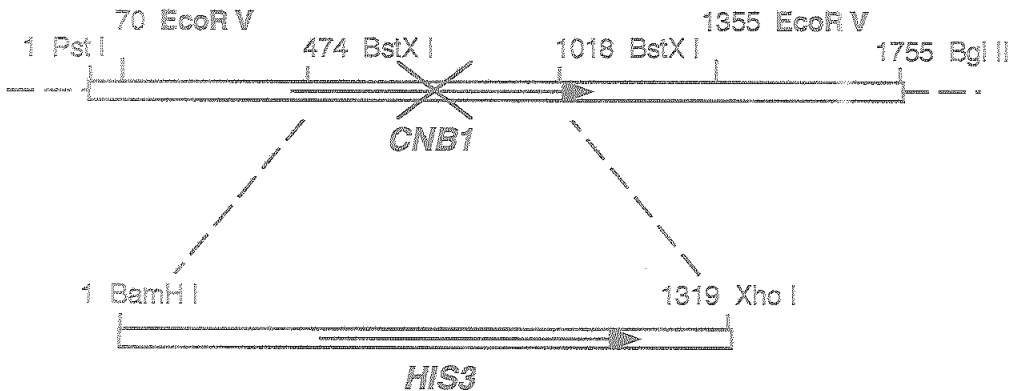


Figura 10. Disrupción del gen *CNB1*. El plásmido pST1-12 (que contiene el gen *CNB1* en un fragmento *BglII/PstI* de 1.75 kb) se digirió con *BStXI* para eliminar 544 pares de bases de la zona codificante del gen *CNB1*. Se utilizó el enzima T4 DNA polimerasa para rellenar los extremos 3' protuberantes y éstos se trataron posteriormente con fosfatasa alcalina para evitar su religado. Por digestión del plásmido YIp1 con las endonucleasas *BamHI* y *XhoI* se obtuvo un fragmento de 1326 pares de bases conteniendo el gen *HIS3*. Los extremos de este fragmento se rellenaron con el enzima de modificación Klenow para facilitar su inserción en el plásmido abierto pST1-12/*BstXI*, obteniéndose pST1-13. La digestión del plásmido pST1-13 con *EcoRV* (en negrita) libera un fragmento de  $\approx$  2 kb que contiene el gen *HIS3* flanqueado con secuencias homólogas al gen *CNB1*. Con este fragmento se transformaron cepas de levadura auxótrofas para histidina para obtener disruptantes *cnb1::HIS3*.

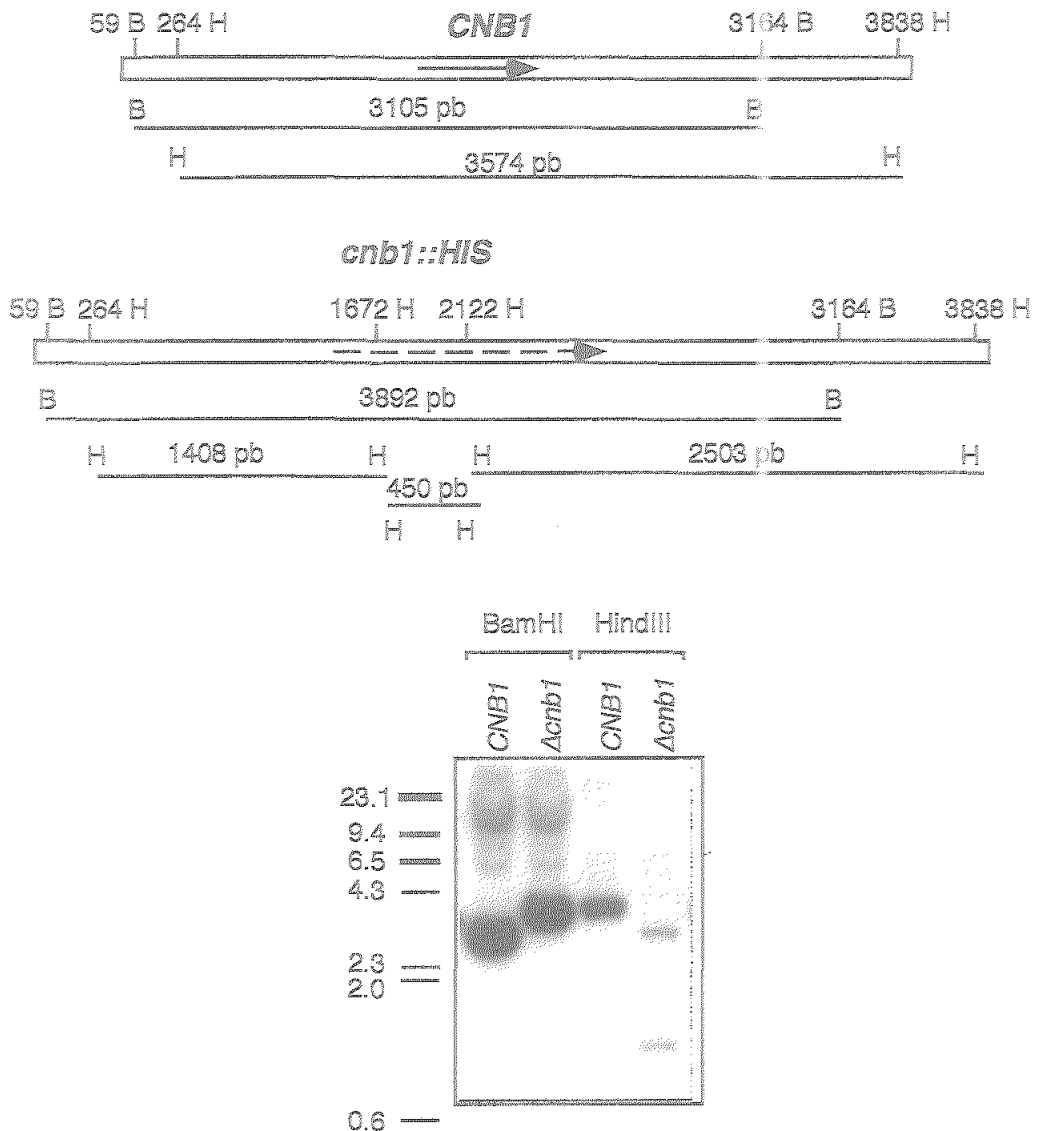


Figura 11. Comprobación de los disruptantes  $\Delta cnb1$  por hibridación de Southern. DNA extraído de la cepa JP5 transformada o no con el fragmento  $\Delta cnb1::HIS3$  se digirió separadamente con las endonucleasas BamHI y HindIII. Los fragmentos de restricción se resolvieron en un gel, se transfirieron a un filtro de nylon y se hibridaron con un fragmento BamHI de 3.1 kb que contiene el gen *CNB1*. En la cepa sin transformar se obtuvo una banda de hibridación de  $\approx 3.1$  kb en las muestras digeridas con BamHI y 3.6 kb en las digestiones con HindIII. En la cepa transformada con *cnb1::HIS3* se observó una banda de 3.9 kb en las muestras digeridas con BamHI y dos bandas, de  $\approx 2.5$  y  $\approx 1.4$  kb en las muestras digeridas con HindIII (B, Bam HI; H, HindIII; pb, pares de bases).

catalítica que defosforila proteínas fosforiladas en residuos de serina o treonina. En *S. cerevisiae* existen dos subunidades catalíticas, Cna1 y Cna2, y una sola subunidad reguladora, Cnb1 (Cyert *et al.*, 1991; 1992). La subunidad reguladora Cnb es esencial para el funcionamiento normal de calcineurina en células animales (Klee *et al.*, 1988). En *S. cerevisiae*, la inactivación del gen *CNB1* o la mutación simultánea de las dos subunidades catalíticas, Cna1 y Cna2, produce incapacidad de adaptación a feromona, impidiendo el proceso de desensibilización (Cyert *et al.*, 1991 y 1992). Por tanto, se comparó la sensibilidad a NaCl de mutantes simples  $\Delta cna1$  y  $\Delta cna2$  deficientes en una de las dos subunidades catalíticas de calcineurina, un doble mutante  $\Delta cna1 \Delta cna2$ , y un mutante  $\Delta cnb1$  carente de la subunidad reguladora. Todos los mutantes se generaron en el fondo genético YPH499 (Tabla 1). La sensibilidad a NaCl del doble mutante  $\Delta cna1 \Delta cna2$  fue similar a la del mutante  $\Delta cnb1$  (Tabla 7). Por el contrario, los mutantes simples  $\Delta cna1$  y  $\Delta cna2$  presentaron un grado intermedio de sensibilidad. El mutante  $\Delta cna2$  era ligeramente más sensible que  $\Delta cna1$ , sugiriendo que Cna2 tiene una mayor contribución que Cna1 en el crecimiento en NaCl, en coincidencia con resultados en otros laboratorios (Cyert *et al.*, 1991, Foor *et al.*, 1992, Nakamura *et al.*, 1993). Estos resultados indican que la mutación *cnb1/nls1* conduce a la completa inactivación de calcineurina.

### 3.2.2. Calcineurina regula la homeostasis de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

#### 3.2.2.1. Regulación del gen *ENA1* por calcineurina.

La similitud en los fenotipos de los mutantes *nls1/cnb1* y *enal* (sensibilidad a Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> y pH alcalino, mayor acumulación de Li<sup>+</sup>) sugería que las proteínas calcineurina y Ena1 podrían estar involucradas en los mismos procesos de homeostasis iónica. Haro *et al.* (1991) habían demostrado que la salida de Li<sup>+</sup> (análogo del Na<sup>+</sup>) en un mutante *enal-4* era prácticamente nula. Para determinar la posible regulación de la actividad de Ena1 por calcineurina se procedió a la disrupción del gen *CNB1* en la estirpe RH16, carente de genes *ENA*.. Ambas estirpes se transformaron con el plásmido pGB34 que contiene el gen *ENA1* completo en el vector centromérico YCp50 (Tabla 4), de manera que la actividad Ena1 es la única presente en dichas células. Como era de esperar, las células RH16( $\Delta ena$ ) y JP14 ( $\Delta ena \Delta cnb1$ ) sin transformar con el plásmido pGB34 carecían de la capacidad de expulsar Li<sup>+</sup> tras un período de carga con LiCl y transferencia a un medio sin sal (Figura 12). La medición del flujo neto de salida Li<sup>+</sup> en el disruptante *cnb1* conteniendo el plásmido pGB34 demostró una significativa reducción en la velocidad de salida (0.53 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) respecto a su control con calcineurina funcional (0.97 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) (Figura 12).

La reducción del 50% de la velocidad de salida neta de Li<sup>+</sup> en el disruptante  $\Delta cnb1$  sugería que calcineurina podría ser necesaria para la regulación de la Na<sup>+</sup>-ATPasa Ena1. Puesto



Tabla 7. Tolerancia a NaCl de mutantes derivados de la estirpe YPH499.

Cepas	IC <sub>50</sub>
YPH499	1.14
<i>Δcna1</i>	0.84
<i>Δcna2</i>	0.71
<i>Δcna1Δcna2</i>	0.58
<i>Δcnb1</i>	0.58

Los valores de IC<sub>50</sub> se refieren a concentraciones molares de NaCl.

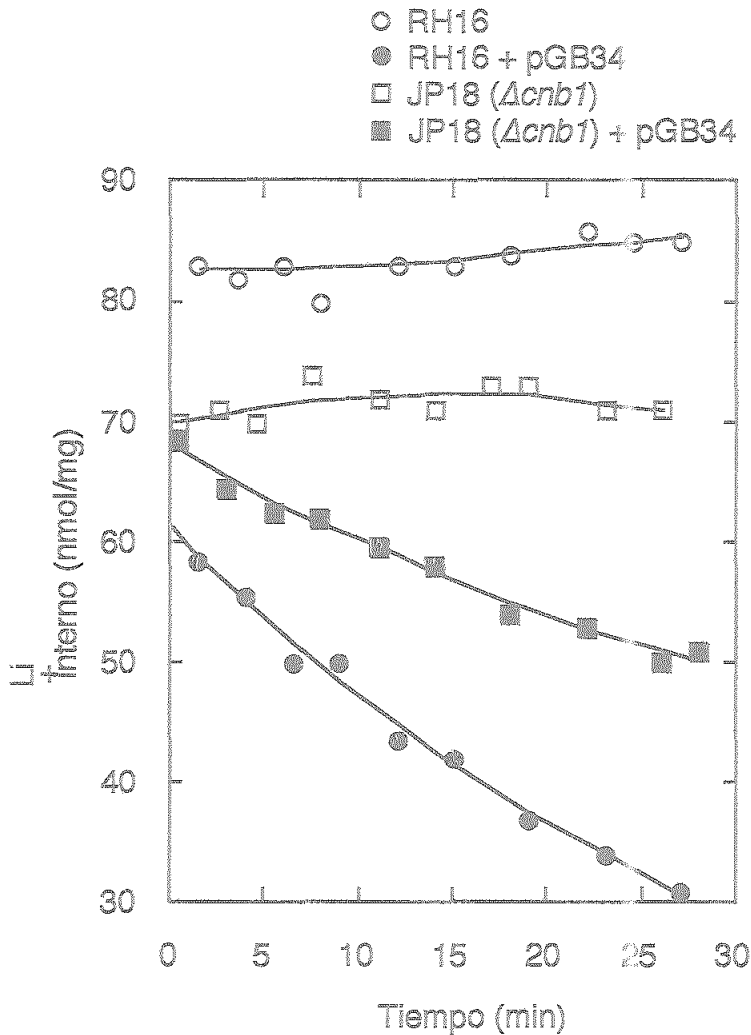


Figura 12. Salida de litio de células  $\Delta cnb1$ . Células de la estirpe RH16 y JP18 ( $\Delta cnb1$ ) transformadas o no con pGB34 (*ENA1* en el plásmido monocopia YCp50), se cargaron con  $\text{Li}^+$  en medio AP con 0.2 mM KCl y 50 mM LiCl. Después de 30 minutos, la concentración de iones se llevó a 50 mM KCl y 10 mM LiCl añadiendo AP con 62.5 mM KCl. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, y se midió la concentración de  $\text{Li}^+$  de las células. Los valores están normalizadas al peso seco de la muestra.

que la transcripción del gen *ENAI* es inducible por  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y pH alcalino (Garcíadeblas *et al.*, 1993), y se había demostrado que calcineurina modula la expresión de genes de interleukinas en linfocitos mediante defosforilación de factores de transcripción específicos (Clipstone *et al.*, 1992), se determinó si calcineurina participaba en la inducción transcripcional de *ENAI*. La transcripción de *ENAI* se monitorizó usando el plásmido pFR70i que contiene el promotor del gen *ENAI* y una fusión *ENAI::LacZ* entre los primeros aminoácidos de la proteína Ena1 y el enzima  $\beta$ -galactosidasa (Garcíadeblas *et al.*, 1993). La actividad  $\beta$ -galactosidasa medida en extractos celulares sirve de indicador del nivel de expresión del promotor del gen *ENAI*. Para evitar variaciones experimentales debidas a un número variable de plásmidos episómicos en las células transformadas, así como la alteración de la regulación génica por un alto número de copias del gen, el plásmido pFR70i se integró en el locus *URA3* por recombinación homóloga con el marcador presente en el plásmido. Como se esperaba, en la estirpe silvestre GRF167 la expresión basal de la construcción *ENAI::LacZ* fue baja en medio YPD y se indujo por NaCl y pH alcalino (Tabla 8). En un mutante *cnb1* esta inducción se redujo a la mitad, tanto en su actividad basal como en condiciones de inducción.

Para correlacionar de forma directa el nivel de expresión de la fusión *ENAI::LacZ* con la velocidad de salida de  $\text{Li}^+$ , se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las estirpes RH16 ( $\Delta ena1$ ) y JP18 ( $\Delta ena1 \Delta cnb1$ ), ambas transformadas con pFR70i, e incubando las células en condiciones similares a las del experimento de salida de  $\text{Li}^+$  (medio AP con 50 mM LiCl. Figura 12). En presencia de 50 mM LiCl, la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las células *cnb1* fue la mitad que en el control *CNBI*, coincidente con la reducción del 50% en la velocidad de salida de  $\text{Li}^+$ . El crecimiento en medio AP tiene un efecto inductor *per se* en la expresión de *ENAI::LacZ* (García de Blas *et al.*, 1993). También en este caso, la mutación *cnb1* redujo sustancialmente la expresión basal (en ausencia de LiCl) de *ENAI::LacZ* (Tabla 8).

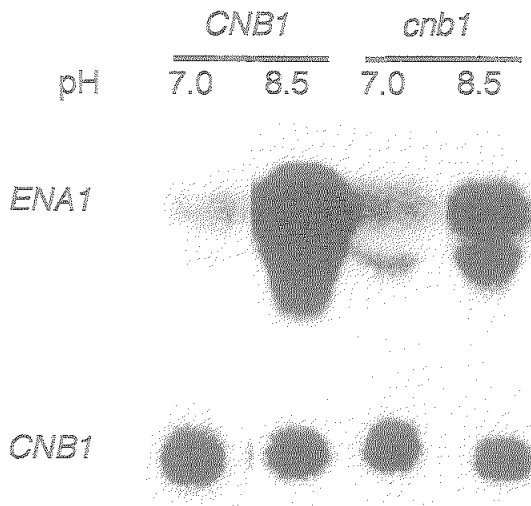
La expresión del gen silvestre *ENAI* se estimó mediante una hibridación 'northern', comparando la cantidad de mRNA de *ENAI* en un mutante *cnb1* (estirpe SS2) frente al silvestre GRF167, en células crecidas en medio tamponado a pH 8.5 (Figura 13). Medidas de densitometría de las señales autoradiográficas indicaron una reducción de 3 veces en la abundancia del mRNA de *ENAI* en el mutante *cnb1* respecto a la estirpe silvestre en condiciones de inducción por pH alcalino. Por el contrario, el nivel de transcripción de *CNBI* se mantuvo constante, no induciéndose por pH alcalino.

De estos resultados se puede concluir que la sensibilidad a NaCl y LiCl de los mutantes *cnb1* se debe a una menor expresión del gen *ENAI*, que se traduce en una reducción en la actividad de expulsión de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  por la  $\text{Na}^+$ -ATPasa codificada por *ENAI*.

Tabla 8. Medidas de la expresión de *ENAI::LacZ* en células  $\Delta cnb1$ .

Cepa	Medio	$\beta$ -galactosidasa
GRF(pFR70i)	YPD pH 7.0	0.9 $\pm$ 0.7
	YPD + 0.4 M NaCl	11 $\pm$ 4.2
	YPD pH 8.5	15.5 $\pm$ 2.7
SS2(pFR70i)	YPD pH 7.0	0.5 $\pm$ 0.2
	YPD + 0.4 M NaCl	4.3 $\pm$ 1.0
	YPD pH 8.5	9.1 $\pm$ 0.7
RH16(pFR70i)	AP (3 mM K <sup>+</sup> )	20.6 $\pm$ 4.4
	AP + 50 mM Li <sup>+</sup>	21.2 $\pm$ 5.2
JP18(pFR70i)	AP (3 mM K <sup>+</sup> )	5.6 $\pm$ 2.2
	AP + 50 mM Li <sup>+</sup>	8.4 $\pm$ 1.2

Se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa de células de las estirpes GRF167, SS2 (*cnb1*), RH16 ( $\Delta ena$ ) y JP18 ( $\Delta cnb1\Delta ena$ ), que llevan integrado el plásmido pFR70i, tras 30 minutos de incubación en los medios indicados en la segunda columna. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa se obtuvieron según se indica en la sección 2.2.7. Se muestra la media de 3-4 experimentos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  S.E.



**Figura 13. Niveles de RNAm de *ENA1* y *CNB1* en células *CNB1* y *cnb1*.** Células de las estirpes GRF167 y SS2 se incubaron durante 1 h en YPD a pH 7.0 ó 8.5. El RNA total se transfirió a membrana de nylon y se hibridó sucesivamente con sondas *ENA1* y *CNB1*. El tamaño de los ARNm fue de 3.8 kb para *ENA1* y 0.85 kb para *CNB1*. Se hizo un experimento similar pero incubando las células 1 h en YPD + NaCl 0.4 M, pero no se observaron diferencias en la expresión de *ENA1* respecto al control sin sal.

### 3.2.2.2. Calcineurina es necesaria para el transporte de $K^+$ de alta afinidad en presencia de NaCl.

Cuando se comparó la tolerancia a NaCl de un mutante JP14 ( $\Delta cnb1$ ) y un mutante isogénico RH16 ( $\Delta ena$ ), se observó que no había diferencia significativa en los valores de  $IC_{50}$  (Tabla 9), indicando que la inactivación de calcineurina producía células más sensibles a sal de lo que cabría esperar teniendo en cuenta que la reducción de la expresión de *ENAI* y de la velocidad de salida de  $Li^+$  en un mutante *cnb1* era de tan sólo un 50%. En levaduras, la entrada de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Li^+$  ocurre a través de sistemas de transporte comunes, a favor de sus respectivos gradientes electroquímicos (Borst-Pauwels, 1981). Los valores de  $K_m$  para la entrada de estos iones varía, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Bajo estrés por  $Na^+$  (pero no  $Li^+$ ), el sistema Trk1/Trk2 de transporte de  $K^+$  cambia a un estado de alta afinidad por  $K^+$ , permitiendo una mayor discriminación entre  $K^+$  y  $Na^+$ , reduciendo así la entrada de  $Na^+$  (Haro *et al.*, 1993). Junto con la expulsión dependiente de las  $Na^+$ -ATPasas *Ena*, la capacidad de seleccionar  $K^+$  frente a otros cationes es un factor importante en la tolerancia a NaCl (Haro *et al.*, 1993). Para determinar si calcineurina regulaba la actividad del sistema Trk, se midió la tolerancia a  $Na^+$  de un doble mutante  $\Delta cnb1 \Delta ena1$  (estirpe JP18) y de células *CNB1* $\Delta ena$  (estirpe RH16) en condiciones de bajo potasio (medio AP con 0,5 mM KCl). Como se indica en la Tabla 8, el doble mutante *cnb1 ena* era más sensible a  $Na^+$  ( $IC_{50} \approx 21$  mM) que un mutante *ena1* con una calcineurina funcional ( $IC_{50} \approx 54$  mM). Como ambas estirpes carecen de mecanismos de expulsión de  $Na^+$ , este resultado sugería una mayor entrada de  $Na^+$  en el mutante *cnb1*.

Para ver el efecto de la disrupción de *CNB1* sobre la selectividad para la entrada de  $K^+$  y  $Na^+$ , se crecieron las cepas DBY746 y JP14 ( $\Delta cnb1$ ) en medio AP suplementado con 0.5 mM de  $K^+$  y diferentes concentraciones de  $Na^+$ . Puesto que un mutante *cnb1* es más sensible y acumula más  $Na^+$  que una célula silvestre, se seleccionaron, por pares, varias concentraciones de  $Na^+$  que producían inhibiciones en el crecimiento y cargas de  $Na^+$  similares en ambas estirpes. Las células DBY746 y JP14 ( $\Delta cnb1$ ) crecidas en 150 mM de  $Na^+$  y 50 mM  $Na^+$ , respectivamente, contenían aproximadamente 250 nmol/mg de  $Na^+$  y 300 nmol/mg de  $K^+$ . Los contenidos fueron de 325  $Na^+$ /250  $K^+$  nmol/mg cuando las células DBY746 y JP14 ( $\Delta cnb1$ ) se crecieron en 300 mM  $Na^+$  y 65 mM  $Na^+$ , respectivamente. En condiciones en las que la proporción intracelular de  $Na^+/K^+$  era próxima a 1, las células silvestres exhibieron el modo de alta afinidad para la toma de  $K^+$  (medida como entrada de  $Rb^+$ ) (Ramos *et al.*, 1990), mientras que las células  $\Delta cnb1$  mantuvieron su sistema de baja afinidad. La  $K_m$  para  $Rb^+$  en las células silvestres fue de  $80 \pm 10$   $\mu M$  (con una  $K_i$  por  $K^+$  de  $10 \pm 2$   $\mu M$ ) y en las células  $\Delta cnb1$ , de  $1.6 \pm 0.2$  mM ( $K_i$  por  $K^+$  fue de  $0.2 \pm 0.02$  mM) (Figura 14). Las células  $\Delta cnb1$  crecidas en medio AP estándar (3 mM  $K^+$ ), mostraron en ausencia de  $Na^+$  una cinética de entrada de  $Rb^+$  de baja afinidad similar a la del silvestre

Tabla 9. Tolerancia del doble mutante  $\Delta cnb1\Delta ena1$ .

Cepas	Medio	IC50 NaCl
JP14 ( $\Delta cnb1$ )	YPD	0.15 M
RH16 ( $\Delta ena1$ )	YPD	0.17 M
RH16 ( $\Delta ena1$ )	AP + 0.5 mM K <sup>+</sup>	54 mM
JP18 ( $\Delta cnb1\Delta ena1$ )	AP + 0.5 mM K <sup>+</sup>	21 mM

Se indica concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de NaCl en medio rico YPD y medio sintético AP + 0.5 mM K<sup>+</sup>.

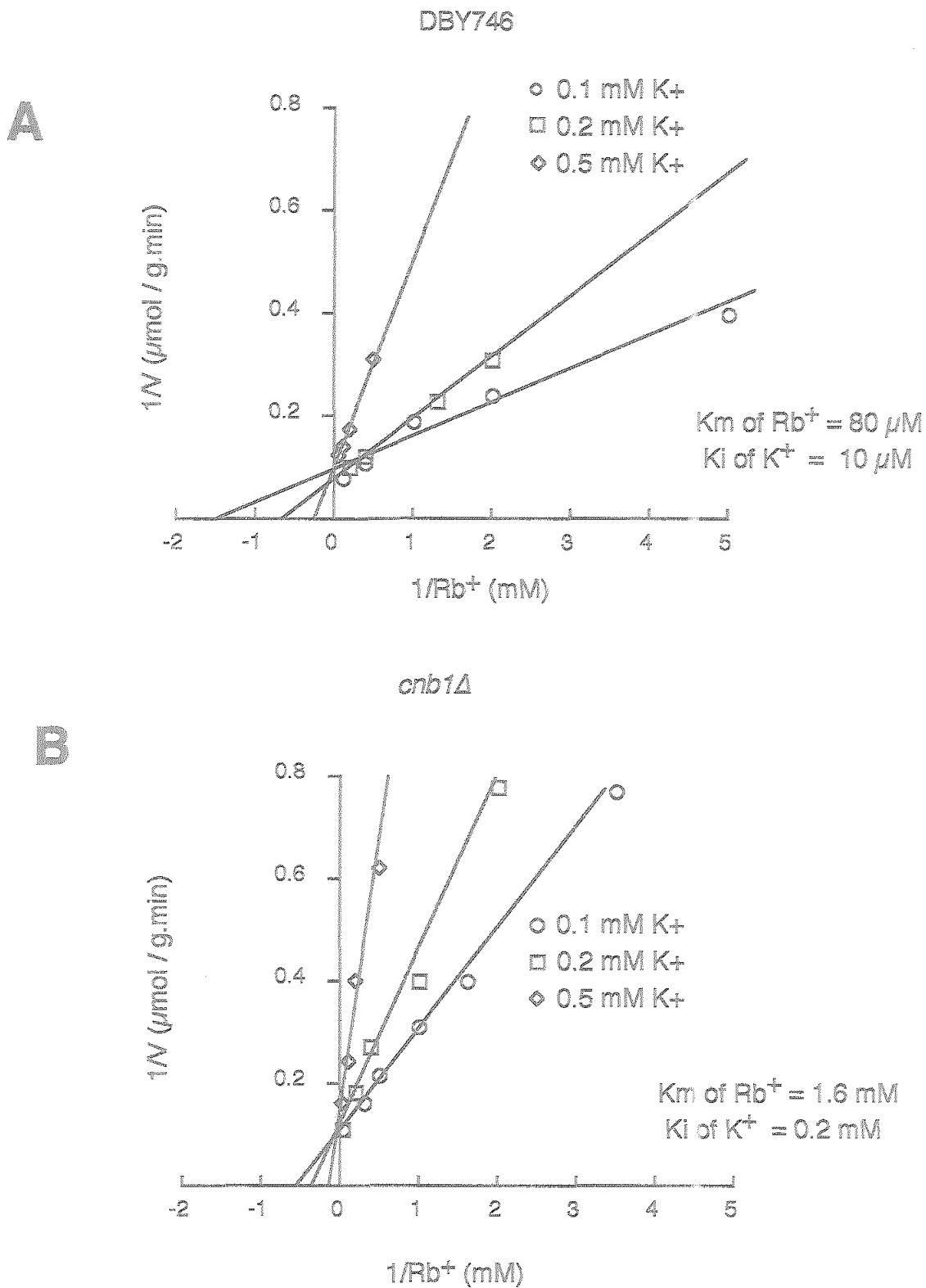


Figura 14. Entrada de K<sup>+</sup> en células  $\Delta cnb1$ . (A) DBY746. (B) JP14 ( $\Delta cnb1$ ).



( $K_m$  de 6 mM y  $K_i$  por  $K^+$  de 3 mM). Por tanto, la actividad calcineurina es necesaria para la transición del sistema de transporte de  $K^+$  de baja a alta afinidad en respuesta a estrés por  $Na^+$ . El modo de alta afinidad para la toma de  $K^+$  en levadura resulta de la exposición de células a  $Na^+$  (Ramos *et al.*, 1990), o a un medio bajo en  $K^+$  (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984) y calcineurina podría ser un factor común en esta transición. Sin embargo, experimentos en los que se midió entrada de  $Rb^+$  en células DBY746 y JP14 ( $\Delta cnb1$ ) indicaron que calcineurina no estaba implicada en la transición al estado de alta afinidad de transporte de  $K^+$  mediado por hambre de  $K^+$  (resultados no mostrados).

Para investigar la existencia de otros mecanismos dependientes de calcineurina que pudieran contribuir a la tolerancia celular a NaCl, diferentes de los sistemas ENA y TRK, se investigó el efecto de la disrupción *cnb1* en la estirpe TE12 ( $\Delta ena\Delta trk1$ ). Las células TE12 y JP21 ( $\Delta cnb1\Delta ena\Delta trk1$ ) eran indistinguibles en lo que se refiere a sensibilidad a  $Na^+$  y  $Li^+$ , ya fuera en medio YPD o AP. Por tanto, no parecía haber ningún otro mecanismo por el cual una mutación *cnb1* pudiera contribuir a una mayor sensibilidad a  $Na^+$ .

### 3.3. Activación de calcineurina *in vivo*.

#### 3.3.1. Obtención de una calcineurina con actividad constitutiva *in vivo*.

##### 3.3.1.1. Sobreexpresión de la subunidad catalítica.

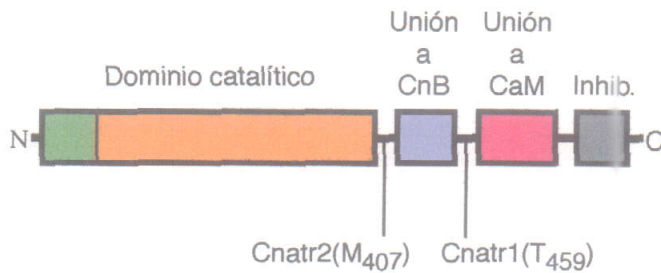
Calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad reguladora (Cnb) y una subunidad catalítica (Cna). En ausencia de  $Ca^{2+}$  el enzima es inactivo. Para su activación es necesaria la unión de  $Ca^{2+}$  a la subunidad reguladora y a calmodulina, que a su vez se unen a la subunidad catalítica dando lugar un complejo heterotrimérico activo. En *S. cerevisiae* se han encontrado dos subunidades catalíticas (Cna1 y Cna2), y una subunidad reguladora (Cnb1). En este trabajo y en otros (Cyert *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993) se ha demostrado que la subunidad reguladora es esencial para el funcionamiento normal de la proteína. La inactivación del gen *CNBI* produce el mismo efecto que la falta de las dos subunidades catalíticas: sensibilidad a NaCl y LiCl (Tabla 7; Nakamura *et al.*, 1993) e incapacidad de adaptación a feromonas (Cyert *et al.*, 1991 y 1992).

La subunidad catalítica Cna contiene cuatro dominios funcionales: (1) región catalítica en la zona amino terminal muy similar a fosfatasas de tipo PP2A, (2) sitio de unión a la subunidad reguladora Cnb, (3) sitio de unión de calmodulina y (4) un dominio autoinhibidor en el extremo carboxilo (Kincaid, 1993). Experimentos *in vivo* en células de mamíferos indicaban que la truncación de la subunidad catalítica, eliminando el sitio de unión de calmodulina y el

dominio inhibidor da lugar a un enzima con actividad fosfatasa constitutiva, que no requiere la unión calmodulina y es independiente de la señal de calcio (Parsons *et al.*, 1994). Con objeto de determinar las consecuencias de la activación constitutiva de calcineurina en la homeostasis de cationes alcalinos, se procedió a la generación de formas truncadas de la subunidad catalítica de calcineurina. Se eligió la subunidad catalítica Cna2 porque un mutante  $\Delta cna2$  era ligeramente más sensible a NaCl que un mutante  $\Delta cna1$ , sugiriendo que Cna2 tiene una mayor contribución que Cna1 a la actividad calcineurina necesaria para el crecimiento en condiciones de alta sal (ver sección 3.2). Siguiendo la misma estrategia ensayada en células animales, se sintetizó por PCR una secuencia de 1.39 kb correspondiente a la región codificante del gen *CNA2* truncado después de la treonina en la posición 459, con lo que se eliminaban los dominios de unión a calmodulina y el dominio inhibidor (Figura 15 y 16). A esta truncación se la denominó Cna2tr1. Además, se generó una forma truncada adicional (Cna2tr2) en la que se delecionó el extremo carboxilo hasta la metionina en la posición 407, eliminando también el dominio de unión a Cnb1 (Figura 15 y 16). Como control también se sintetizó por PCR la zona codificante de *CNA2* completa, de  $\approx 1.8$  kb. Los fragmentos sintetizados por PCR que contenían los alelos *CNA2tr1*, *CNA2tr2* y *CNA2* se clonaron en el vector pIB61, para obtener los plásmidos pCA2tr1, pCA2tr2 y pCA2 (ver Figura 17). El plásmido pIB61 es un derivado del vector episómico YEp351 que contiene el promotor y señal de terminación del gen *PMA1* de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*. El promotor de *PMA1* da lugar a una fuerte expresión del gen, que unido al alto número de copias por la presencia del replicón del DNA de 2 $\mu$ , garantiza unos elevados niveles de expresión de las proteínas Cna2 recombinantes. Los plásmidos pCA2tr1, pCA2tr2 y pCA2 se usaron para transformar la cepa YPH499 y sus derivados  $\Delta cnb1$  y doble mutante  $\Delta cna1\Delta cna2$ , con objeto de comprobar la funcionalidad de los alelos de *CNA2* sintetizados por PCR. Se seleccionaron los transformantes en medio sólido YNB sin leucina y se comprobó su tolerancia en medio conteniendo NaCl y LiCl. Como se indica en la Tabla 10, el plásmido pCA2tr1, al igual que pCA2, fue capaz de complementar al doble mutante  $\Delta cna1\Delta cna2$ . Por tanto, la delección de los dominios de unión a calmodulina y autoinhibidor da lugar a una subunidad catalítica funcional. Sin embargo, pCA2tr1 no complementó al mutante  $\Delta cnb1$ . Además, pCA2tr2, que contiene una subunidad catalítica en la que se ha eliminado también el dominio de unión a Cnb1, fue incapaz de complementar al doble mutante  $\Delta cna1\Delta cna2$ . Estos resultados demuestran que la unión de la subunidad reguladora Cnb1 es absolutamente necesaria para la actividad de Cna2 *in vivo*, incluso si se deleciona el dominio autoinhibidor.

### 3.3.1.2. Sobreexpresión de la subunidad catalítica y reguladora.

Ya que la sobreexpresión de la subunidad catalítica, nativa o truncada, era insuficiente para obtener una actividad calcineurina constitutiva, independiente de la subunidad



**Figura 15. Dominios en Cna2.** La zona codificante completa de *CNA2* se sintetizó por PCR usando un par de oligonucleótidos específicos que se unen al codón de inicio de la traducción en la cadena con sentido (CCCTCGAGGCAATGTCTTCAGACGCT) y el codón de parada en la cadena antisentido (CTCGAGCTATTTGCTATCATTCTT). Los alelos de *CNA2* que producen proteínas truncadas en el extremo carboxilo terminal se produjeron combinando el primer cebador con los oligonucleótidos antisentido AACTCGAGTTAGGTGTCGTTTTCCAGCTC ó CTCGAGTTACATAACATTATTTTC para introducir codones de parada después de los residuos de aminoácidos T<sub>459</sub> ó M<sub>407</sub> respectivamente. Todos los cebadores contenían sitios de restricción XhoI (subrayados) para facilitar clonaje. La caja naranja y verde representa el dominio catalítico en el extremo amino terminal de la proteína Cna2. Los sitios de unión de la subunidad reguladora Cnb1 y de calmodulina se representan por la caja violeta y rosada respectivamente. El dominio autoinhibidor en el extremo carboxilo terminal se representa en gris.

```

1  MSSDAIRNTEQINAAIKIIENKTERPQSSTTPIDSKASTVAANSTATET
1  MSE-----PKAIDPK-----

51  SRDLTQYTLDDGRVVSINRRIMNKVPAITSHVPTDEELFQPNGIPRHEFL
11  -----LSTIDRVVKAVPFPPSHRLTAKEVFQNDGKPRVDIL

101 RDHFKREGKLSAAQAARIVTLATELFSKEPNLISVPAPIITVCGDIHGQYF
47  KAHLMKREGRLAESVALRIIIEGASILRQEKNLIDIDAPVIVCGDIHGQFF

151  DLLKLFVEVGGOPATTSYFLFLGDYVDRGSFSFECLIIYLYSLKLNFNDFHWL
97  DLMKLFVEVGGSPANDRYLFLGDYVDRGYFSIECVLYLWALKILLYPKTLFL

201  LRGNHECKHLTSYFTFKNEMLHKYNLDIYEKCCSFNNLPIAALMNGOYL
147  LRGNHECRHLTEYFTFKOECKIKYSERVYDADMADFDCLPIAALMNOQFL

251  CVHGGISPELNSLQDINNLNRFREIIPSHGLMCDLLWADPIEYDEVLDKD
197  CVHGGLSPEINTLQDIRKLDRFKEPPAYGPMCDILWSDPLEDFGN-----

301  LTEEDIVNSKTMVPHHGKMAPSRDMFVFNPSVRGCSYAFTYRAACHFLOET
242  -----EKTQEHFTHNIVRGCSYFYSYPAVCFLOHNS

351  GLLSITRAHEAODAGYRMYKNTKTLGFPSLITLFSAPNYLDIYNNKAAIL
273  NLLSILRAHEAODAGYRMYRKSQITGFPSLITLFSAPNYLDVYNNKAAVIL

*
401  KYENNVMNIRQFNMTPHPYWLPDFMDVFTWSLPFVGEKVTMLVAAILNLC
323  KYENNVMNIRQFNCSPPHYWLPDFMDVFTWSLPFVGEKVTMLVNVNLC

*
451  TEDELNDTPVIEELVGTDKKLPQAGKSEATPQPATSASPKHASILDDEH
373  SDELGSEEDGFDGATAA-----

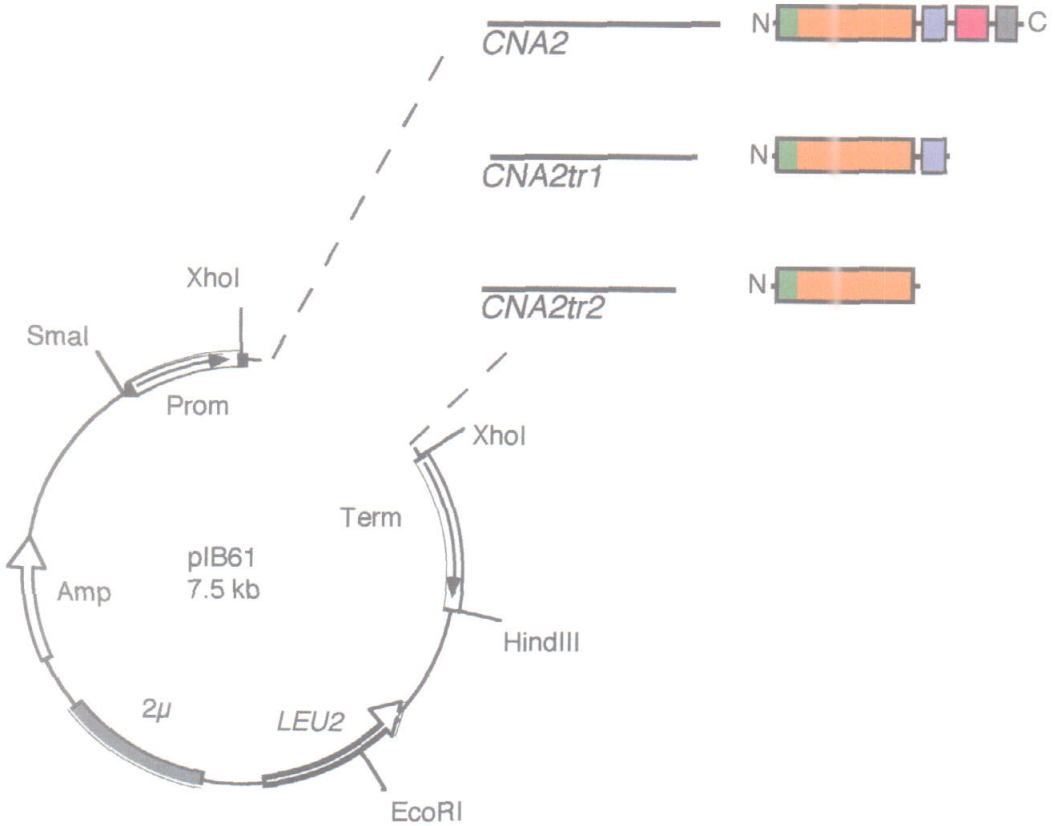
501  RRKALRNKILAVAKVSRMYSVLREEINQVQFLKDHNS-GVLPFGALSNQV
392  RKEVIRNKIRAIQKMARVFSVLREESESVLTLKGLTPTGMLPSGVLSGSK

550  KGLDEA-----LSTFERARKHDLINELPPSLDELK
442  QTLQSAITVEAIEADEAIKGFSPQHKITSFEAKGLDRINERMPRRDAMP

581  NENK-----KYYEKVWQKVHEHDAKNDK.
492  SDANLNSINKALASETNGTDSNGSNSSNIQ

```

**Figura 16. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la subunidad catalítica Cna2 de *S. cerevisiae* (primera fila) y rata (segunda fila).** Las cajas negras indican los aminoácidos idénticos. Las zonas de colores representan el extremo amino terminal (verde), dominio catalítico (naranja), dominio de unión a Cnb1 (azul), dominio de unión a CaM (rosa) y dominio autoinhibidor (gris). Los asteriscos indican las truncaciones Cna2tr1 (T<sub>459</sub>) y Cna2tr2 (M<sub>407</sub>).



**Figura 17. Construcción de los plásmidos para sobreexpresar los alelos de *CNA2*.** Los fragmentos sintetizados por PCR (representados por líneas gruesas) que contienen el gen *CNA2* completo (1815 pb) y las versiones truncadas *CNA2tr1* (1375 pb) y *CNA2tr2* (1221 pb) se insertaron en el vector pIB61 entre el promotor y terminador del gen *PMA1*. A la derecha se muestran las distintas proteínas producidas (ver Figura 15)

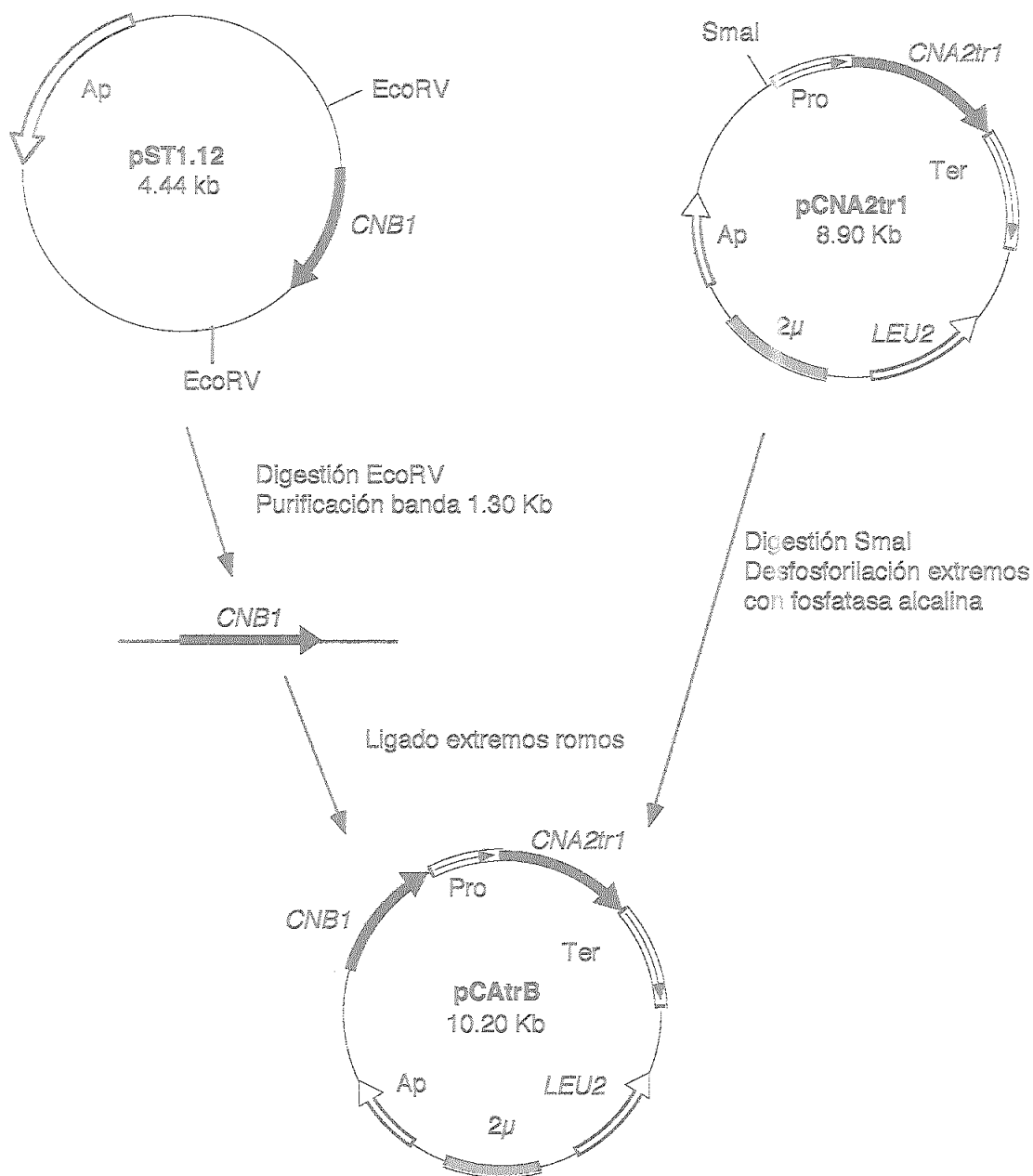
reguladora, fue necesaria la coexpresión de la proteína Cnb1. Para coexpresar las dos subunidades de calcineurina se insertó el gen *CNBI* en los plásmidos pCA2tr1 y pCA2, obteniendo los plásmidos pCAtrB y pCAB (Figura 18). De esta manera se tenía en un mismo plásmido la subunidad reguladora bajo su propio promotor, y la subunidad catalítica (nativa y truncada) entre el promotor y terminador de *PMAI*. Como control, el plásmido pCAtrB se digirió con *XhoI* y se autoligó, escindiendo el gen *CNA2tr1*. El plásmido resultante, pCNB1 sólo expresa la subunidad reguladora Cnb1. Al igual que antes, los plásmidos resultantes pCAtrB y pCAB, se usaron para transformar la cepa YPH499 y sus derivados  $\Delta cna1\Delta cna2$  y  $\Delta cnb1$ , y se comprobó tolerancia a NaCl y LiCl. Como se esperaba, ambos plásmidos complementaron sendos mutantes. El plásmido pCNB1 sólo complementó al mutante  $\Delta cnb1$ .

### 3.3.2. Incremento en la tolerancia a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> por sobreactivación de calcineurina.

Para cuantificar un posible aumento en la tolerancia iónica en células transformadas con todos los plásmidos generados, excepto el que incluía la truncación *Cna2tr2* debido a su aparente inactividad, se midieron los valores de IC<sub>50</sub> para LiCl. Para estos experimentos no se usó la estirpe YPH499 al ser esta cepa muy tolerante a Li<sup>+</sup>. Para inhibir el crecimiento de YPH499 era necesario añadir LiCl a concentraciones elevadas (más de 300 mM), con lo cual un posible incremento en la tolerancia específicamente iónica podría verse enmascarado por el efecto osmótico debido a la alta concentración salina. Por este motivo se midieron las IC<sub>50</sub> en la cepa JP4-7a, congénica con GRF167 y más sensible al componente iónico del estrés salino que YPH499. La expresión simultánea de la subunidad catalítica truncada *Cna2tr1* y la subunidad reguladora Cnb1 aumentó la tolerancia a LiCl de JP4-7a en casi 5 veces, mientras que la expresión única de *Cna2tr1* tuvo un efecto modesto en la tolerancia. La sobreexpresión de Cnb1 no tuvo ningún efecto. La expresión de la proteína Cna2 de longitud completa, junto con la subunidad reguladora Cnb1, no aumentó de forma sustancial la tolerancia a LiCl de células silvestres, lo que sugiere la existencia de otros factores que limitan la actividad de la calcineurina nativa que son dispensables para el complejo *Cna2tr1/Cnb1* (Tabla 10). En la Figura 19 se muestra el incremento de tolerancia a LiCl producido por la expresión de *Cna2tr1/Cnb1* (plásmido pCAtrB) en la estirpe JP4-7a. La sobreactivación de calcineurina aumenta la tolerancia en LiCl. Sin embargo, el crecimiento en el medio sin sal se reduce un 50% aproximadamente respecto al crecimiento del control.

Estos resultados indican que la expresión de una forma recombinante de calcineurina con actividad constitutiva es suficiente para aumentar la tolerancia a cationes alcalinos de células de levadura. A diferencia de lo descrito en las células T, la expresión de una subunidad catalítica truncada carente del dominio inhibitorio no es suficiente para activar de forma





**Figura 18. Construcción de pCAtrB.** El plásmido pST1-12 se digirió con EcoRV, liberándose un fragmento de 1.3 kb conteniendo *CNB1*, que se insertó en el plásmido pCA2tr1 digerido con SmaI y tratado con fosfatasa alcalina para desfosforilar los extremos. De igual forma se construyó pCAB, insertando *CNB1* en pCNA2. El plásmido pCAtrB2, idéntico a pCAtrB pero con marcador *URA3* se obtuvo insertando en YEp352 el fragmento SacI/NarI de 4.66 kb que contiene el gen *CNB1* y el casete de expresión *PMA1::CNA2tr1* de pCAtrB. Ap, resistencia a ampicilina; 2μ, replicón del plásmido 2μ de levadura; Pro, promotor y Ter, terminador del gen *PMA1*.

Tabla 10. Sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> de mutantes calcineurina.

Plásmido	Contenido	$\Delta cna1\Delta cna2$	$\Delta cnb1$	IC <sub>50</sub>
pIB61	vector	-	-	47.0±0.7
pCA2	CNA2 completo	+	-	n.d.
pCA2tr1	CNA2 truncado en T <sub>459</sub>	+	-	68.5±3.5
pCA2tr2	CNA2 truncado en M <sub>406</sub>	-	-	n.d.
pCB1	CNB1		+	51.5±3.0
pCAB	CNA2 y CNB1	+	+	51.5±6.5
pCAtrB	CNA2tr en T <sub>459</sub> y CNB1	+	+	217.5±1.5

Mutantes  $\Delta cna1\Delta cna2$  y  $\Delta cnb1$  de la cepa YPH499 (estirpes MCY100-14A y JP9) se transformaron con plásmidos que contienen el gen *CNA2* (completo o truncado), el gen *CNB1*, o ambos. Los signos + y - indican crecimiento o no de las células transformadas en medio sólido YPD suplementado con 1.2 M de NaCl ó 150 mM LiCl. Los valores de IC<sub>50</sub> se refieren a concentraciones milimolares de LiCl e indican tolerancia de células de la estirpe JP4-7a transformadas con cada uno de los plásmidos indicados. Los valores mostrados representan la media de al menos dos experimentos.



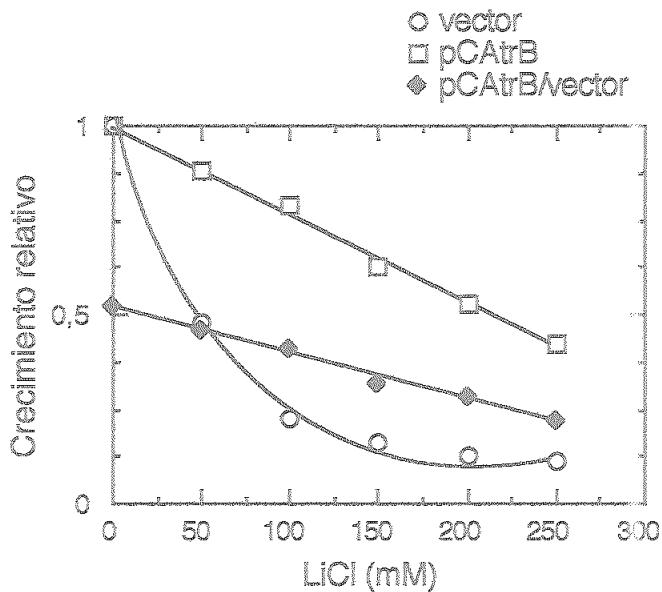


Figura 19. Incremento de tolerancia a  $\text{Li}^+$  de células que sobreexpresan calcineurina. Células de la estirpe JP4-7a transformadas con el plásmido pCAtrB o vector vacío se crecieron en medio mínimo YNB suplementado con distintas concentraciones de LiCl (abscisas). Se hizo un seguimiento del crecimiento de los cultivos mediante mediciones de la densidad óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) a intervalos regulares. En ordenadas se indica la relación entre la velocidad de crecimiento en los medios con LiCl respecto al crecimiento sin LiCl (cuadrados, pCAtrB; círculos, vector vacío). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron 49 mM (pIB61) y 200 mM (pCAtrB) respectivamente. Se muestra también la relación entre la velocidad de crecimiento de las células transformadas con pCAtrB en cada uno de los medios, respecto al crecimiento de las células transformadas con el vector vacío en medio sin LiCl (rombos oscuros).

constitutiva la ruta dependiente de calcineurina, requiriéndose la co-expresión de una subunidad reguladora funcional.

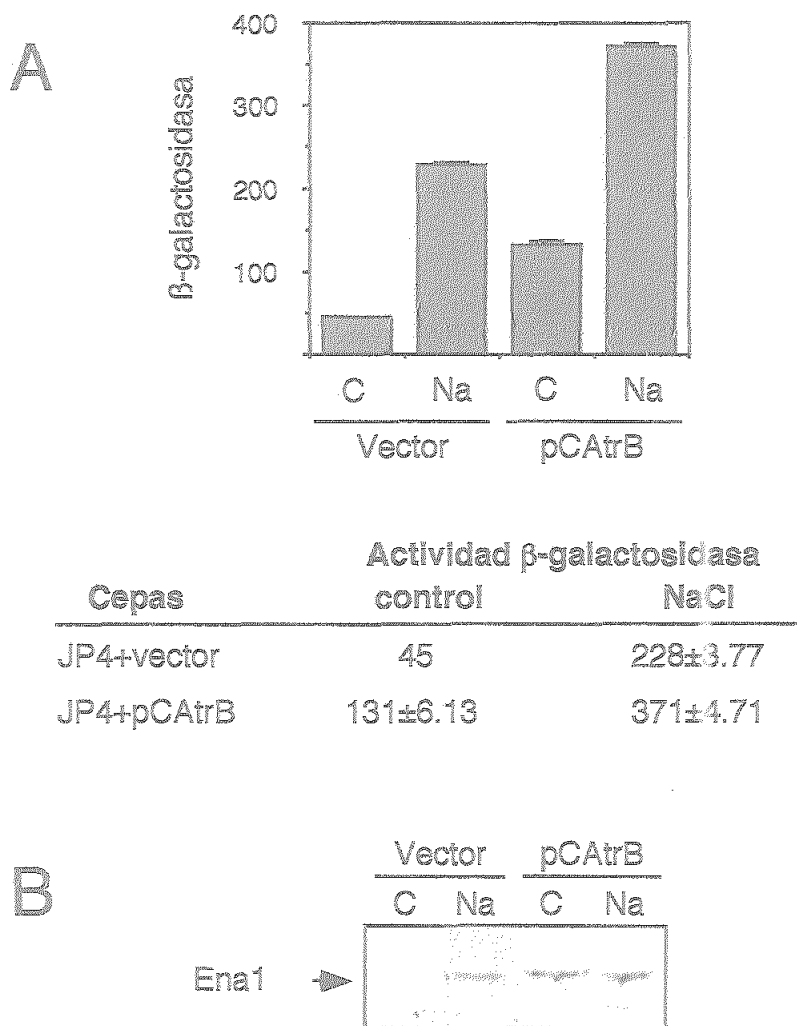
### 3.3.3. Efecto de la activación constitutiva de calcineurina sobre la homeostasis de iones.

#### 3.3.3.1. Incremento en la expresión del gen *ENAI*.

Anteriormente se ha visto que calcineurina es un componente esencial en la ruta de señales que media la homeostasis de cationes alcalinos monovalentes en levadura, a través de la regulación coordinada de los transportadores de entrada (*Trk1*) y de salida (*Ena1*). Posiblemente, la elevada tolerancia de las células que expresan el complejo recombinante *Cna2tr/Cnb1* es el resultado de una actividad  $\text{Na}^+$ -ATPasa incrementada, ya que la salida de iones es el principal determinante en la tolerancia a  $\text{Li}^+$  en *S. cerevisiae*. Para comprobarlo se midió la expresión de *ENAI* en células de la estirpe JP4-7a que contenían una copia integrada de la fusión *ENAI::LacZ* (plásmido pFR70i). Estas células se transformaron con el plásmido pCAtrB y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa antes y después de la inducción de *ENAI::LacZ* con NaCl. Como se puede ver en la Figura 20.A, la presencia de NaCl aumentó cinco veces la actividad transcripcional del promotor *ENAI* en las células silvestres. La coexpresión de *Cna2tr/Cnb1* resultó en un aumento constitutivo de tres veces en la actividad del promotor de *ENAI* en ausencia de estrés, y en un aumento de ocho veces de actividad  $\beta$ -galactosidasa cuando las células se trataron con NaCl. Este aumento de la actividad del promotor de *ENAI* como resultado de la expresión de calcineurina recombinante se tradujo en unos niveles de proteína *Ena1* en la membrana plasmática, sintetizada a partir del gen *ENAI* endógeno, acordes con las actividades transcripcionales medidas. En la Figura 20.B se muestran los resultados de la inmunodetección de *Ena1* en fracciones de membrana plasmática mediante un 'western blot' con anticuerpos policlonales anti-*Ena1*. En células transformadas con un vector vacío y en condiciones de no inducción, los niveles de *Ena1* en fracciones de membrana plasmática fueron indetectables. Tras el tratamiento con 0.5 M NaCl, el polipéptido *Ena1* se acumuló en la membrana plasmática. Las células transformadas con pCAtrB presentaban *Ena1* en la membrana plasmática incluso en condiciones no inductivas, demostrando que la calcineurina recombinante promovía la expresión constitutiva del gen *ENAI* nativo.

#### 3.3.3.2. Efecto sobre *Trk1*.

Con objeto de determinar la contribución relativa de los sistemas *Ena1-4* y *Trk1* al incremento de tolerancia iónica en células que expresaban la calcineurina recombinante, se midieron las velocidades netas de acumulación de  $\text{Li}^+$  en una batería de estirpes con distintas



**Figura 20. Incremento en la expresión de *ENA1* en células que expresan calcineurina recombinante *Cna2tr/Cnb1*. (A)** La cepa silvestre JP4-7A que tiene integrada la fusión *ENA1::LacZ*, se transformó con el plásmido pCAtrB para la expresión conjunta de la subunidad catalítica truncada y subunidad reguladora de calcineurina, o con el vector vacío. Se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de extractos proteicos de estos transformantes después de incubar en NaCl 0.5 M (Na) durante 60 minutos y en medio sin sal como control (C). Se muestran las medias y SE de tres mediciones de actividad  $\beta$ -galactosidasa por mg de proteína para cada transformante y tratamiento, calculada según se describe en la sección 2.2.7. y expresada en unidades arbitrarias Miller. **(B)** Se aislaron fracciones de membrana plasmática de células tratadas como se describe más arriba, se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La proteína Ena1 se detectó inmunológicamente con antisuero de conejo anti-Ena1 y anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina.

combinaciones de genotipos *ENAI-4* y *TRK1*. Para ello se usó la estirpe silvestre DBY746 y sus derivados isogénicos RH16, en el que el tándem *ENAI-EN44* había sido deletado, RH2, un mutante  $\Delta trk1$  incapaz de tomar  $K^+$  en el modo de alta afinidad, y TE12, que carece de los genes *ENAI-4* y *TRK1*. Células silvestres DBY746 transformadas con pCAtrB mostraron una sustancial reducción en la entrada de  $Li^+$  respecto a las células control, en concordancia con la alta tolerancia a NaCl y LiCl adquirida (Figura 21.A). La expresión de *Cna2tr/Cnb1* en células con genotipo *ENAI-4*  $\Delta trk1$  también redujo el flujo de  $Li^+$  (Figura 21.B). En este mutante la entrada de  $Li^+$  está determinada únicamente por la actividad de las proteínas *Ena1-4* ya que la delección de *TRK1* impide cambios en la selectividad entre  $K^+$  y  $Li^+$ . Las células con genotipo  $\Delta ena1-4$   $\Delta trk1$  tenían unas velocidades de entrada de  $Li^+$  similares, tanto si expresaban calcineurina recombinante como si no (Figura 21.D). Todos estos resultados en conjunto indican una mayor actividad del sistema *Ena* en células que expresan la forma activada de calcineurina, como se espera de una mayor expresión del gen *ENAI*.

De forma similar, células  $\Delta ena1-4$  *TRK1* que expresan *Cna2tr/Cnb1* acumularon  $Li^+$  a una velocidad 2 veces menor que las células control cuando se transfirieron a 50 mM  $Li^+$  y 1 mM  $K^+$  (Figura 21.C). Dado que las células  $\Delta ena1-4$  carecen de una salida significativa de  $Li^+$ , esta reducción de la entrada de  $Li^+$  debía depender de la transición del sistema de transporte de  $K^+$  al modo de alta afinidad de toma de  $K^+$ , con una mayor selectividad de  $K^+$  sobre  $Na^+$  y  $Li^+$ . En células silvestres esta transición requiere *Trk1*, depende de calcineurina, y está provocada por estrés sódico. Para demostrar una disminución en la afinidad por  $Li^+$  en células expresando *Cna2tr/Cnb1*, se midieron las velocidades de entrada de  $Li^+$  dependiente de *Trk1* a varias concentraciones externas de LiCl. Se usaron células RH16 ( $\Delta ena1-4$ ) para evitar interferencia por la expresión constitutiva de la ATPasa *Ena1* en células transformadas con calcineurina recombinante *Cna2tr/Cnb1*. A todas las concentraciones de LiCl probadas, las células RH16 que expresaban la forma activada de calcineurina acumularon  $Li^+$  a menor velocidad que las células control RH16. Una representación de doble recíproco de los valores iniciales de entrada de  $Li^+$  indicaron que las células que contenían el plásmido pCAtrB presentaban una afinidad por  $Li^+$  reducida, sin que fuera necesaria una inducción previa por tratamiento con NaCl del modo de alta afinidad de transporte de  $K^+$  (Figura 22) En presencia de 1 mM de  $K^+$ , el valor aparente de  $K_m$  para  $Li^+$  era de 51.8 mM en células control y 130.8 mM en células transformadas con pCAtrB. Este cambio en la afinidad de  $Li^+$  permitió el crecimiento de RH16(pCAtrB) a concentraciones de litio que impedían el crecimiento de RH16 (Figura 23).

Además de *Ena1-4* y *Trk1*, no se pudo identificar otro transporte de  $Li^+$  dependiente de calcineurina, ya que las células con genotipo  $\Delta ena1-4$   $\Delta trk1$  mostraron unos valores similares

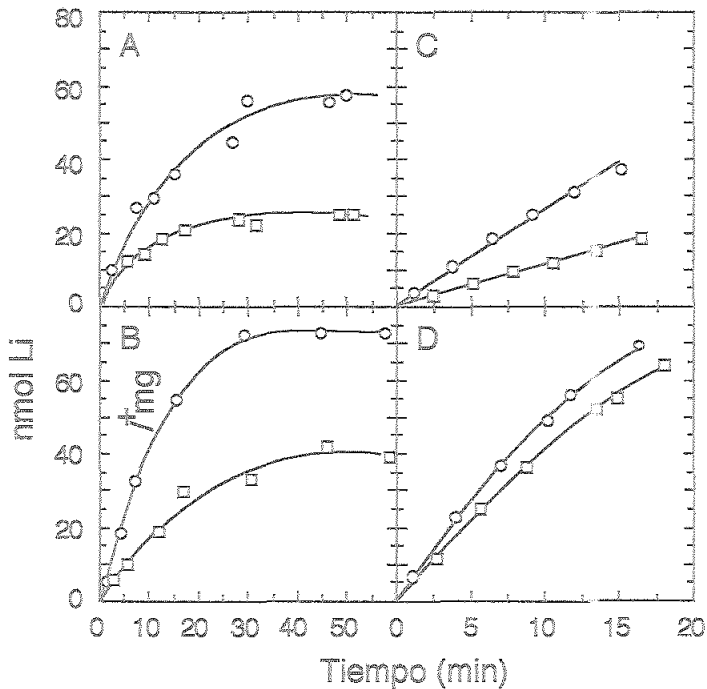


Figura 21. Entrada de litio en células que expresan calcineurina recombinante Cna2tr/Cnb1. Células con los genotipos *ENAI-4 TRK1* (A), *ENAI-4 Δtrk1* (B), *Δenal-4 TRK1* (C), y *Δenal-4 Δtrk1* (D) que expresan calcineurina recombinante (cuadrados) o transformados con el vector vacío (círculos) se incubaron en tampón MES/Ca<sup>2+</sup> que contenía 1 mM de KCl y 50 mM LiCl. Se tomaron muestras en los tiempos que se indican, midiéndose el contenido de Li<sup>+</sup> intracelular. El experimento se realizó dos veces con todas las estirpes, con resultados similares. Los valores de la media y S.D. de la acumulación neta de Li<sup>+</sup> a 45 min (A, B) o 15 min (C, D) en las células control y Cna2tr/Cnb1 fueron respectivamente:  $54.7 \pm 1.8$  y  $26.5 \pm 2.2$  (A),  $65.4 \pm 7.4$  y  $31.8 \pm 7.8$  (B),  $34.6 \pm 0.8$  y  $19.7 \pm 1.8$  (C) y  $68.0 \pm 2.6$  y  $56.2 \pm 0.1$  (D).

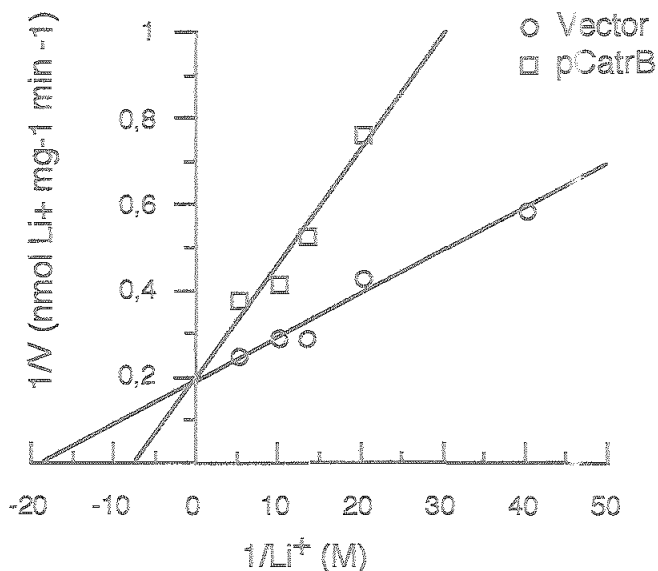


Figura 22. Reducción de la afinidad para la entrada de  $Li^+$  en células que expresan calcineurina recombinante *Cna2tr/Cnb1*. Se midió entrada de  $Li^+$  en células RH16 (*ena1-ena4*) para evitar la interferencia por la expresión constitutiva de *Ena1* en las células transformadas con pCAtrB. Los valores iniciales de toma de  $Li^+$  en células RH16 transformadas con el plásmido vacío (círculos) o pCAtrB (cuadrados) se midieron a concentraciones externas de  $LiCl$  comprendidas entre 25 y 200 mM en tampón  $MES/Ca^{2+}$  con 1 mM  $K^+$ . Los valores aparentes de  $K_m$  para  $Li^+$  extrapolados de una representación de dobles recíprocos fueron de 51.8 mM en células control y 130.8 mM en células con calcineurina activada.

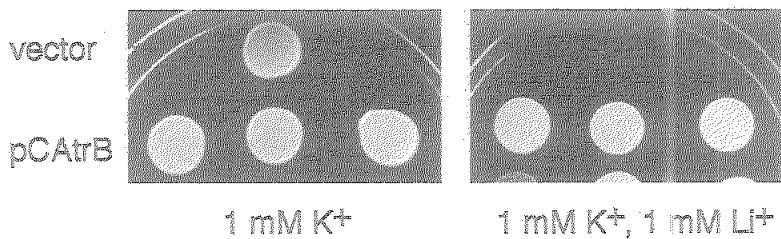


Figura 23. La sobreactivación de calcineurina aumenta la tolerancia a  $\text{Li}^+$  del mutante *enal-4*. Células de la estirpe RH16( $\Delta$ *enal-4*) transformadas con pCAtrB o vector vacío se crecieron en medio líquido AP suplementado con 1 mM KCl hasta  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se sembraron gotas de  $\approx 5 \mu\text{l}$  en placas con medio sólido AP suplementado con 1 mM KCl con y sin 1 mM LiCl. Las placas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 2 días.

de toma de  $\text{Li}^+$  (Figura 21) y de tolerancia a  $\text{LiCl}$  tanto si expresaban calcineurina activada como si no.

En conjunto, estos resultados indican que una activación continuada de calcineurina resulta en un estado permanente de adaptación a estrés iónico. Es decir, el sistema de toma de  $\text{K}^+$  está en el modo de transporte de alta afinidad antes de la inducción por  $\text{Na}^+$ , y la proteína *Ena1* se expresa de forma constitutiva. Además, la capacidad de respuesta transcripcional del gen *ENA1* a estrés iónico está incrementada. La consecuencia de esta adaptación precoz y aumentada es un incremento dramático en la supervivencia cuando células que expresan *Cna2tr/Cnb1* se someten a concentraciones potencialmente letales de  $\text{LiCl}$  y  $\text{NaCl}$ . Así, alrededor de un 90% de células JP4-7 transformadas con *pCAtrB* fueron capaces de sobrevivir tras sembrarse en medio sólido YNB suplementado con 0.3 M  $\text{LiCl}$  ó 1.2 M  $\text{NaCl}$ , condiciones en las que las células control fueron incapaces de desarrollar colonias (Figura 24).

### 3.3.4. La activación constitutiva de calcineurina altera el patrón de gemación y la morfología celular.

Además del aumento en la tolerancia a sodio y litio se observó que la activación de calcineurina de forma constitutiva provocaba un ligero retardo en el crecimiento de las células en medio líquido (Figura 19) y una disminución de la capacidad de formar colonias en medio sólido. Observaciones al microscopio revelaron que se producían alteraciones en la forma y tamaño de un gran número de células, que pasaban de redondeadas a alargadas. Esto se observó en varias estirpes (Figura 25). Para estimar la proporción de células alargadas se halló la relación axial entre longitud y anchura de las células de varios genotipos. En células silvestres de la estirpe DBY746 la relación axial media estimada fue de 1.18 (SE = 0.007, n = 123 células). Sólo un 2% de las células sobrepasaba un relación axial de 1.4 (Figura 26.A). Sin embargo, cuando se expresaba calcineurina activada, el 75% de las células tenía una relación axial comprendida entre los valores 1.4 y 3.2, con un valor promedio de 1.78 (SE = 0.026, n = 335) (Figura 26.C). Estas alteraciones en la morfología ocurrían en menor medida cuando se sobreexpresaba la forma silvestre *Cna2/Cnb1* (Figura 26.B). Sólo el 13.8% de las células transformadas con *pCAB* tenían una relación axial de mayor de 1.4 y el valor promedio estimado fue de 1.27 (SE = 1.27, n = 217).

Frecuentemente el tipo celular alargado formaba racimos de células como si tras la gemación no se hubieran separado las células hijas de las madres (Figura 25.D). Estos racimos se disgregaban con una leve sonicación, indicando que se había completado la citoquinesis. Se utilizó el colorante Calcoflúor Blanco para teñir los anillos de quitina que se forman durante la división celular, comprobándose que las células alargadas que formaban



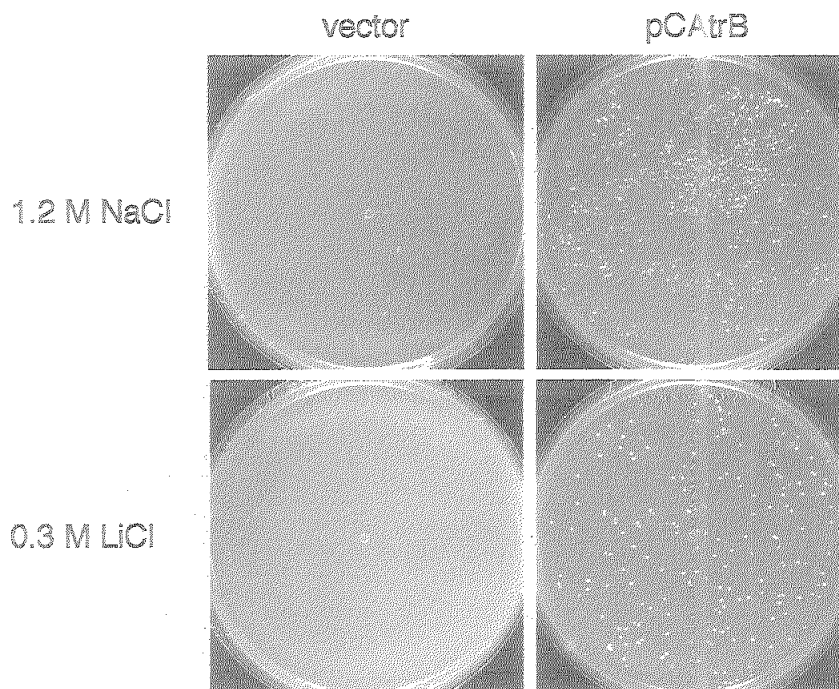
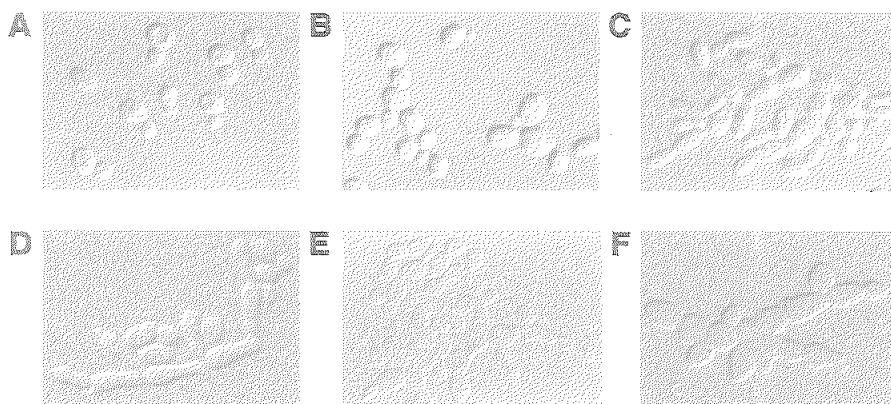
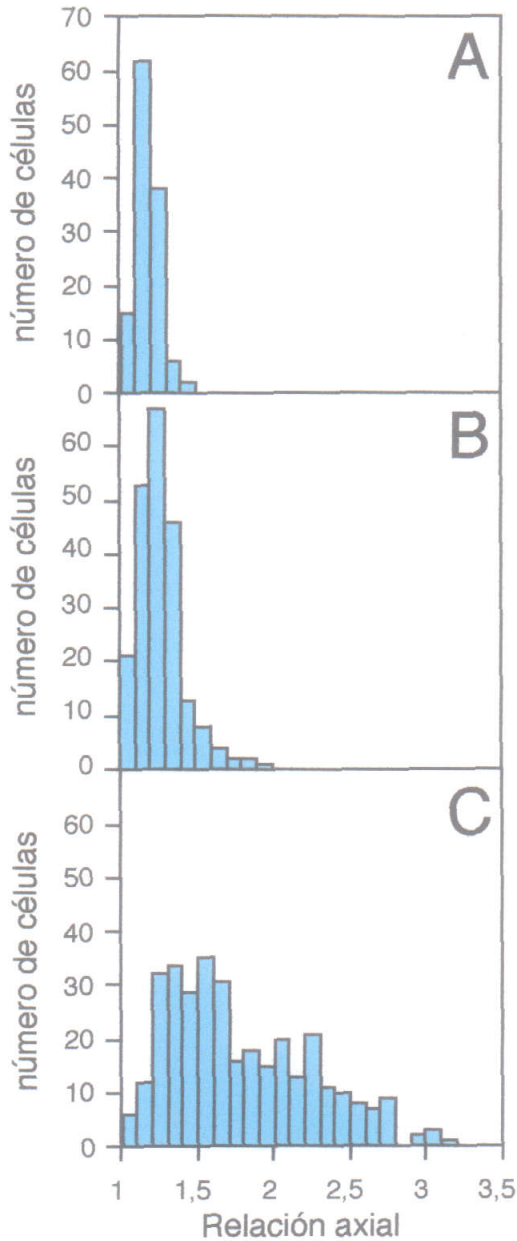


Figura 24. Supervivencia en NaCl y LiCl de células de la estirpe JP4-7a transformadas con pCAtrB o vector vacío (pIB61). Se tomaron células de cultivos líquidos en crecimiento exponencial, se sembraron diluciones adecuadas en medio sólido YNB suplementado con 1.2 M NaCl ó 0.3 M LiCl. La supervivencia de las células transformadas con pCAtrB fue de  $\approx 80\%$  en 1.2 M NaCl y  $\approx 90\%$  en 0.3 M LiCl. Las placas se fotografiaron después de 5 días de incubación a 30°C. Durante ese tiempo no apareció ninguna colonia en placas equivalentes con células transformadas con el vector vacío.



**Figura 25. Morfología de las células que expresan calcineurina recombinante.** Células de la estirpe DBY746 transformadas con vector vacío (A), plásmido pCAB para la expresión de calcineurina silvestre (B), o el plásmido pCAtrB que codifica para la calcineurina recombinante Cna2tr/Cnb1 (C), se recogieron durante la fase exponencial y se fotografiaron con óptica Nomarski. También se muestran microfotografías de células diploides DBY746 (D), haploides W303 (E) y haploides TE12 ( $\Delta ena\Delta trk1$ ) (F) transformadas con pCAtrB.



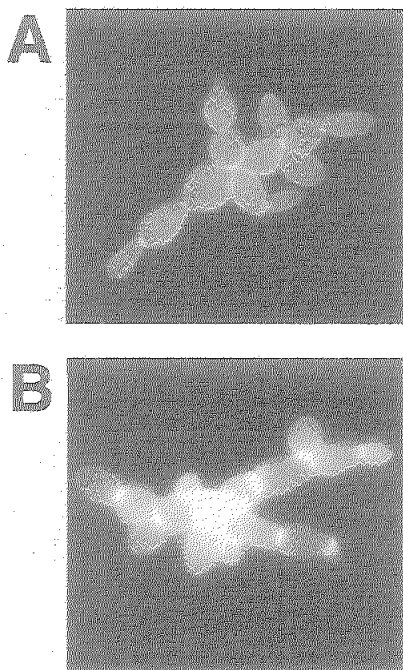
**Figura 26. Distribución de frecuencias de categorías morfométricas.** En un microscopio óptico se tomaron fotografías al azar de preparaciones de células de la estirpe DBY746 transformadas con un vector vacío (A), con el plásmido pCAB para la sobreexpresión de calcineurina nativa (B), o con el plásmido pCAtrB para la expresión de calcineurina activada (C). Se midió la longitud (L) y anchura (A) de todas las células que aparecían en dichas fotografías, computándose la relación axial (L/A), que se clasificó en categorías discretas. Se representan las frecuencias de células observadas pertenecientes a las distintas categorías de relaciones axiales. Los números de células medidas fueron: A, 123 células; B, 210 células; C, 335 células.

los racimos estaban separadas por anillos de quitina y estaban por tanto relacionadas clonalmente y no simplemente adheridas (Figura 27).

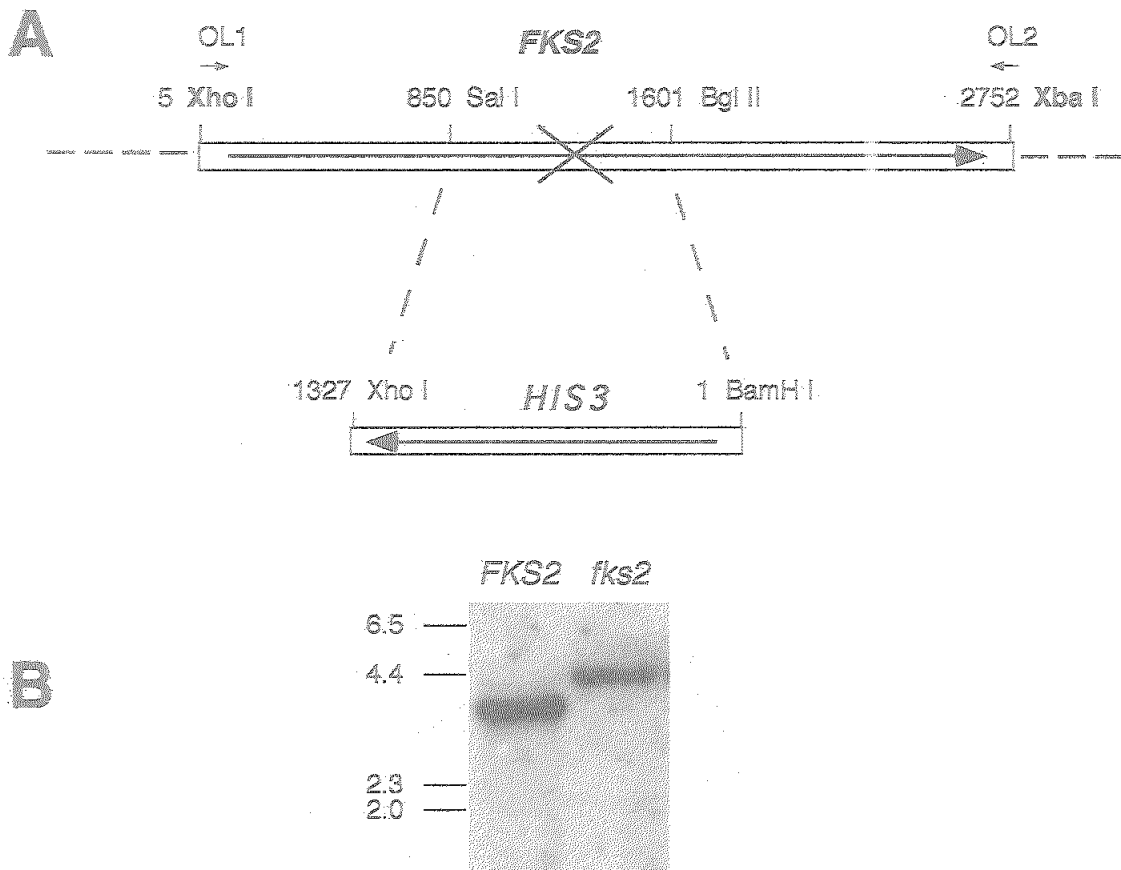
Estos cambios morfológicos que tienen lugar en la célula cuando se sobreactiva calcineurina no parecen tener relación con las prolongaciones que se producen en la superficie de células haploides como paso previo a la conjugación (schmoo), ya que tienen lugar también en células diploides. Por otro lado, la conjugación y formación de cigoto no se ven afectados por la sobreactivación de calcineurina.

Para ver si estos cambios en la forma y crecimiento de la célula tenían relación con alteraciones en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se expresó *Cna2tr/Cnb1* en las estirpes RH16 ( $\Delta\text{ena1-4}$ ) y TE12 ( $\Delta\text{ena1-4} \Delta\text{trk1}$ ). Las células resultantes tenían un fenotipo similar al de la estirpe silvestre DBY746 transformada con el mismo plásmido: células alargadas y retardo en el crecimiento (Figura 25.F). Por tanto las alteraciones en el crecimiento y forma celular producidas por sobreactivación de calcineurina no tienen relación con el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  ya que ocurren incluso en ausencia de los genes involucrados.

Además de la homeostasis de iones, se han identificado otros procesos celulares regulados por calcineurina en *S. cerevisiae* que podrían explicar la elongación celular. Los genes *FKS1* y *FKS2* codifican dos isoformas de 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa. Una mutación *fks1* es sintéticamente letal cuando se combina con la mutación calcineurina porque la expresión de *FKS2* es dependiente de calcineurina y el doble mutante *fks1 fks2* no es viable (Mazur *et al.*, 1995). Si la síntesis de la pared celular es defectuosa se pueden producir alteraciones en la morfología celular y retardo en el crecimiento (Stratford M., 1994). Se investigó si los cambios morfológicos producidos por la activación de calcineurina se debían a perturbaciones en la expresión de *FKS2*. Para ello se comprobó el efecto de sobreactivar calcineurina en células con un gen *FKS2* interrumpido. La interrupción  $\Delta\text{fks2}$  se realizó en la estirpe W303 como se describe en la Figura 28.A, comprobándose mediante una hibridación tipo 'Southern' (Figura 28.B). La estirpe resultante (JP30) transformada con el plásmido pCAtrB se observó al microscopio, comprobándose que seguían apareciendo células con morfología alargada. Por tanto, se puede concluir que los cambios morfológicos que tienen lugar cuando calcineurina está sobreactivada no se deben a que la regulación de *FKS2* esté alterada, ya que siguen teniendo lugar cuando el gen no es funcional. Tampoco parece haber relación entre la actividad 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa dependiente de *FKS2* y el incremento de tolerancia por sobreexpresión de calcineurina, ya que la expresión de calcineurina recombinante también aumentó la tolerancia a LiCl en células  $\Delta\text{fks2}$  (resultados no mostrados).



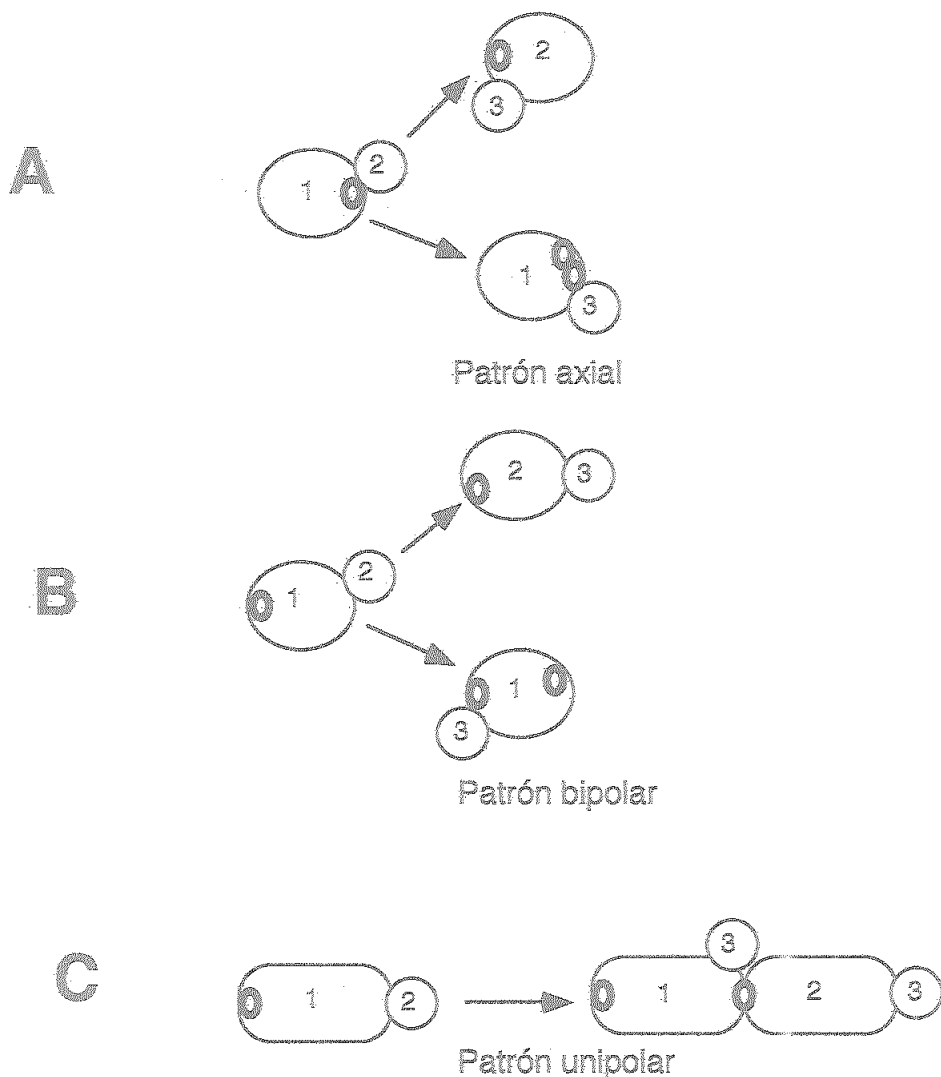
**Figura 27. Microfotografía de fluorescencia de células teñidas con calcoflúor blanco.** (A) Microfotografía de fluorescencia de DBY746 transformada con pCAtrB y teñido con calcoflúor blanco que revela los anillos de quitina formados entre las células madres e hijas. La mayoría de las células gemaron en el polo distal a su propio polo de nacimiento. (B) Células TE12, carentes de los genes *ENA1-4* y *TRK1*, también mostraron células alargadas y gemación polar después de la transformación con el plásmido pCAtrB.



**Figura 28. Disrupción del gen *FKS2*.** (A) Se amplificó por PCR un fragmento de 2760 pb conteniendo el gen *FKS2*, usando los oligonucleótidos ATGTCTCGAGAACAGGCCCTTT (sentido) y TAATCTAGACCTGATTTTCAAACAC (antisentido) que incluyen respectivamente las dianas de restricción para *Xho*I y *Xba*I (subrayadas) para facilitar la clonación del fragmento amplificado. El fragmento amplificado se introdujo en el vector pSK digerido con los mismos enzimas de restricción y se secuenció parcialmente el producto de PCR para confirmar su identidad con la secuencia de *FKS2*. Se eliminó un fragmento de 751 pb interno a *FKS2* por digestión con las endonucleasas *Bgl*II y *Sal*I, introduciendo en su lugar un fragmento *Bam*HI/*Xho*I de 1326 pb conteniendo el gen *HIS3* como marcador para seleccionar los transformantes. Finalmente, el fragmento de 3335 pb conteniendo la disrupción *fks2*::*HIS3* se separó del vector mediante los enzimas de restricción *Xba*I y *Xho*I, y se usó para transformar células de levadura. (B) Comprobación de la disrupción *fks2*::*HIS3* por hibridación de Southern. Se digirió DNA total de las cepas W303-1A (*FKS2*) y JP30 ( $\Delta$ *fks2*) con la endonucleasa de restricción *Eco*RV. Las muestras digeridas se resolvieron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon, e hibridaron con el fragmento *Bam*HI/*Xho*I de 2.7 Kb que contiene el gen silvestre *FKS2*. Se obtuvieron bandas de hibridación de  $\approx$ 3.7 kb en la estirpe silvestre y de  $\approx$ 4.35 kb en los disruptantes *fks2*::*HIS3*.

La sobreexpresión de la proteína Pam1, de función desconocida, suprime el defecto en el crecimiento causado por la pérdida de actividad de la subunidad catalítica de la proteína-fosfatasa PP2A, que en *S. cerevisiae* está codificada por los genes *PPH21*, *PPH22* y *PPH3* (Hu *et al.*, 1994). La proteína-fosfatasa PP2A es un enzima esencial, presente en todas las células eucarióticas e implicada en la regulación de varios procesos metabólicos así como en el control de la progresión del ciclo celular. Además de su capacidad de suprimir la letalidad debida a la deficiencia de PP2A, la sobreexpresión de Pam1 induce un fenotipo filamentoso, semejante al observado al sobreactivar calcineurina. Esto sugería que ambos fenómenos podrían estar relacionados y que una de las consecuencias de la activación de calcineurina podría ser un incremento en los niveles de Pam1. Para comprobar esta hipótesis se expresó la calcineurina recombinante Cna2tr/Cnb1 en un mutante *pam1* (estirpe H405). Se observó que aún en ausencia de Pam1 la expresión de calcineurina recombinante producía las mismas alteraciones morfológicas (resultados no mostrados). Por tanto, no parece existir un mecanismo de regulación de *PAM1* por calcineurina que pudiera explicar los cambios morfológicos inducidos por la sobreactivación de calcineurina. Por otro lado, la expresión de Cna2tr/Cnb1 también aumentó la tolerancia a LiCl en un mutante *pam1* (resultados no mostrados).

Gimeno *et al* (1992) observaron que células diploides de *S. cerevisiae* (en especial de la estirpe  $\Sigma$ 1278b), en respuesta a déficit de nitrógeno, sufren una transición dimórfica que supone cambios en la forma de las células y en el patrón de división celular que resulta en un crecimiento filamentoso invasivo. Las células se hacen largas y finas y forman pseudohifas que se proyectan hacia el exterior de la colonia e invaden el medio, infiltrándose en el agar. Este tipo de crecimiento permite a las células de levadura buscar nutrientes con mayor eficiencia que la permitida por la simple difusión de éstos. Una pseudohifa se define como una frágil cadena de células con características morfológicas intermedias entre una cadena de células de levadura y una hifa de hongos filamentosos (Gimeno *et al.*, 1992). La levadura *S. cerevisiae* se divide mitóticamente por gemación. La yema emerge de un lugar en la superficie de la célula y crece mientras que la célula madre permanece con un tamaño relativamente constante. Las células madre e hija se separan después de que una copia de los cromosomas pase a la yema. Una cicatriz de quitina se deposita en el lugar de separación y marca convenientemente los lugares de gemaciones anteriores. Una sola célula puede gemar muchas veces. Los sucesivos puntos de gemación no se distribuyen al azar en la superficie celular sino que siguen un patrón específico. La polaridad de la división celular se define con respecto a la posición de gemaciones previas. Existen tres patrones de división celular (Figura 29). En el patrón axial, característico de células haploides MATa ó MAT $\alpha$ , las células forman nuevas yemas en un sitio adyacente al de gemaciones previas, incluida la de su propio nacimiento. En el patrón bipolar de células diploides MATa/MAT $\alpha$  la primera yema aparece en el polo opuesto al de nacimiento de la célula madre, y las yemas



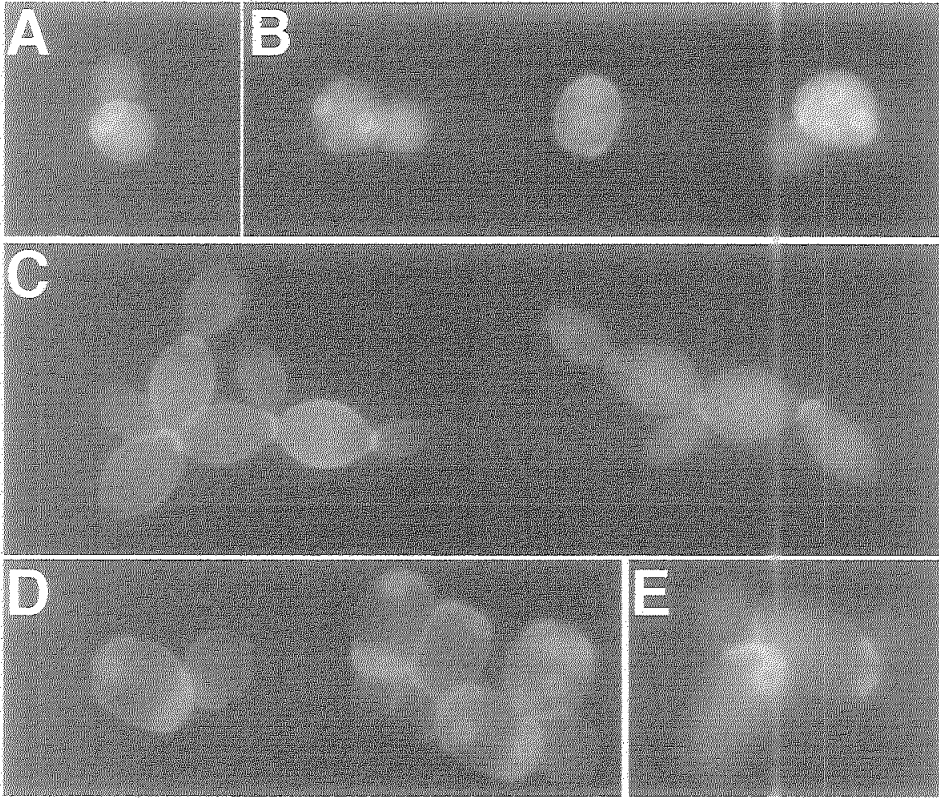
**Figura 29. Patrones de gemación en *S. cerevisiae*.** Los números en cada célula indican generaciones sucesivas. Las células circulares pequeñas representan las yemas que dan lugar a las células hija. Los anillos con trazado grueso representan las cicatrices de quitina que marcan los puntos de gemación anteriores, excepto en las células de la primera generación, donde indica su polo de nacimiento. (A) En el patrón axial, todas las gemaciones se producen en lugares adyacentes al polo de nacimiento. (B) En el patrón bipolar, la primera yema se produce en el polo opuesto al de nacimiento, y las yemas sucesivas alternan entre ambos polos. (C) En el patrón unipolar de las pseudohifas, las células siempre geman por el polo opuesto al de su nacimiento, dando lugar a cadenas de células.



subsiguientes aparecen en cualquiera de los dos polos. El crecimiento en pseudohifa requiere un patrón unipolar, en el que la gemación se produce siempre en el polo opuesto al de nacimiento (Gimeno *et al.*, 1992).

La capacidad de las células que expresan la proteína recombinante Cna2tr/Cnb1 para formar hileras de células alargadas sugieren un patrón de gemación unipolar, típico del crecimiento en pseudohifa. Para establecer el patrón de división de tipos celulares con distintos niveles de actividad calcineurina, se usó el colorante calcioflúor blanco para teñir los anillos de quitina de las uniones celulares y las cicatrices dejadas por divisiones anteriores. Las células haploides de la estirpe silvestre DBY746 mostraban un patrón axial en el 92.2% de las 192 observadas. Sin embargo, una mayoría de las células alargadas que expresan la forma activada de calcineurina habían cambiado a un patrón unipolar (Figura 30). Así, de 244 células alargadas observadas, la gemación era unipolar en el 77.9%, 18% tenían cicatrices en los dos polos y sólo 4.1% presentaban un patrón axial. Las células que mantenían la forma redondeada seguían dividiéndose según un patrón axial, indicando que los dos fenómenos, forma alargada y gemación unipolar están íntimamente ligados. Además, se comprobó que mientras que células haploides silvestres de la cepa DBY746 presentaban gemación axial, las de un mutante isogénico *cnb1* mostraban un patrón indefinido. De 219 células *cnb1* observadas, en el 79.5% de los casos las yemas aparecieron de forma aleatoria, en cualquier lugar de la superficie de la célula madre. La gemación era axial en el 2.7% y polar en el 17.8% restante. Estas alteraciones en el patrón de gemación se observaron también en diploides. Células diploides de la estirpe W303 silvestre presentaron un patrón de gemación bipolar, mientras que cuando expresaban la forma activada de calcineurina la gemación se hacía unipolar (Figura 30). Por tanto, parece existir una relación entre el nivel de actividad calcineurina de la célula y el patrón de gemación.

La similitud en la morfología y patrón de gemación de las células que expresan calcineurina sobreactivada con las pseudohifas descritas por Gimeno *et al.*, (1992) sugerían que podría haber una relación entre ambos procesos y que la activación de calcineurina provocaba la transición dimórfica al crecimiento invasivo en pseudohifa. Aunque el desarrollo en pseudohifa sólo ocurre normalmente en células diploides en condiciones de hambre de nitrógeno, Blacketer *et al.* (1993) también observaron formación de pseudohifas en mutantes *elm1-elm3* y *cdc55* en células haploides de la estirpe W303, indicando que alteraciones en la expresión de ciertos genes pueden inducir un crecimiento en pseudohifas constitutivo incluso en células haploides. La expresión de calcineurina activada en células haploides W303-1A (MAT $\alpha$ ) creciendo en medio YNB (muy rico en nitrógeno) también provocó la aparición de células alargadas, con un 74,1% de las células presentando una relación axial superior al valor 1.4 ( $n = 301$ ). Una frecuencia semejante se observó en células haploides W303-1B (MAT $\alpha$ ) y en diploides isogénicos obtenido por cruce de ambas



**Figura 30. Patrón de gemación en estirpes con distintos niveles de actividad calcineurina.** Microfotografías de fluorescencia mostrando células durante la fase de crecimiento exponencial en medio sintético YNB y teñidos con Calcoflúor Blanco para ilustrar las cicatrices de yemas y anillos de quitina de células madre e hija. (A) Patrón de gemación axial en la estirpe haploide DBY746. (B) Gemación aleatoria en la estirpe isogénica JP14 (*cnb1::HIS3*). (C) Gemación por patrón unipolar en la estirpe silvestre DBY746 transformada con pCAtB. (D) Gemación por patrón bipolar en la estirpe diploide W303 silvestre ó (E) transformada con pCAtB.

estirpes. Para comprobar si existía aditividad entre el hambre de nitrógeno y la sobreactivación de calcineurina, células haploides y diploides de la estirpe W303 transformadas con el plásmido pCAtrB se crecieron en medio SLAD, muy pobre en nitrógeno. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la morfología celular de cultivos paralelos en medio SLAD e YNB. El crecimiento en medio SLAD de células W303 control no indujo *per se* la formación de pseudohifas, ni potenció el fenotipo propio de las células con calcineurina activada.

El crecimiento en pseudohifa es generalmente invasivo, con penetración del agar en un medio sólido (Gimeno *et al.*, 1992; Blacketer *et al.*, 1993). Tampoco se observó invasión del agar por las células haploides ni diploides W303 que expresaban calcineurina activada después de incubar las células por un periodo de hasta 4 semanas en medio sólido SLAD.

Las pseudohifas de *S. cerevisiae* tienen un ciclo celular distintivo, caracterizado por una fase G1 acortada y una población dominada por células en la fase G2 porque, tras la replicación de DNA, la mitosis se retrasa hasta que la célula hija crece hasta el mismo tamaño que la madre. Sin embargo, cuando se tiñeron con DAPI los núcleos de las células alargadas Cna2tr/Cnb1 se observó que la división nuclear ocurría antes de que las células hijas alcanzaran el mismo tamaño que las madres. Además, el análisis con citometría de flujo de células haploides de la estirpe W303 en crecimiento exponencial demostró que, al contrario de lo que ocurre con las pseudohifas canónicas, las células expresando Cna2tr/Cnb1 tenían en realidad una fase G1 más larga que las células control transformadas con un vector vacío, en lugar de una fase G1 acortada. Este alargamiento de la fase G1 probablemente se debe al mayor tamaño de las células que expresan calcineurina activada (Figura 31).

En resumen, estos resultados indican que la activación constitutiva de calcineurina altera la morfología celular y el patrón de división, haciéndolos semejantes a los encontrados en células formando pseudohifas. Sin embargo, otras características específicas de la transición dimórfica al crecimiento en pseudohifa, como son la capacidad de invadir el agar o la acumulación de células en la fase G2 del ciclo celular, no se afectan por la activación de calcineurina.

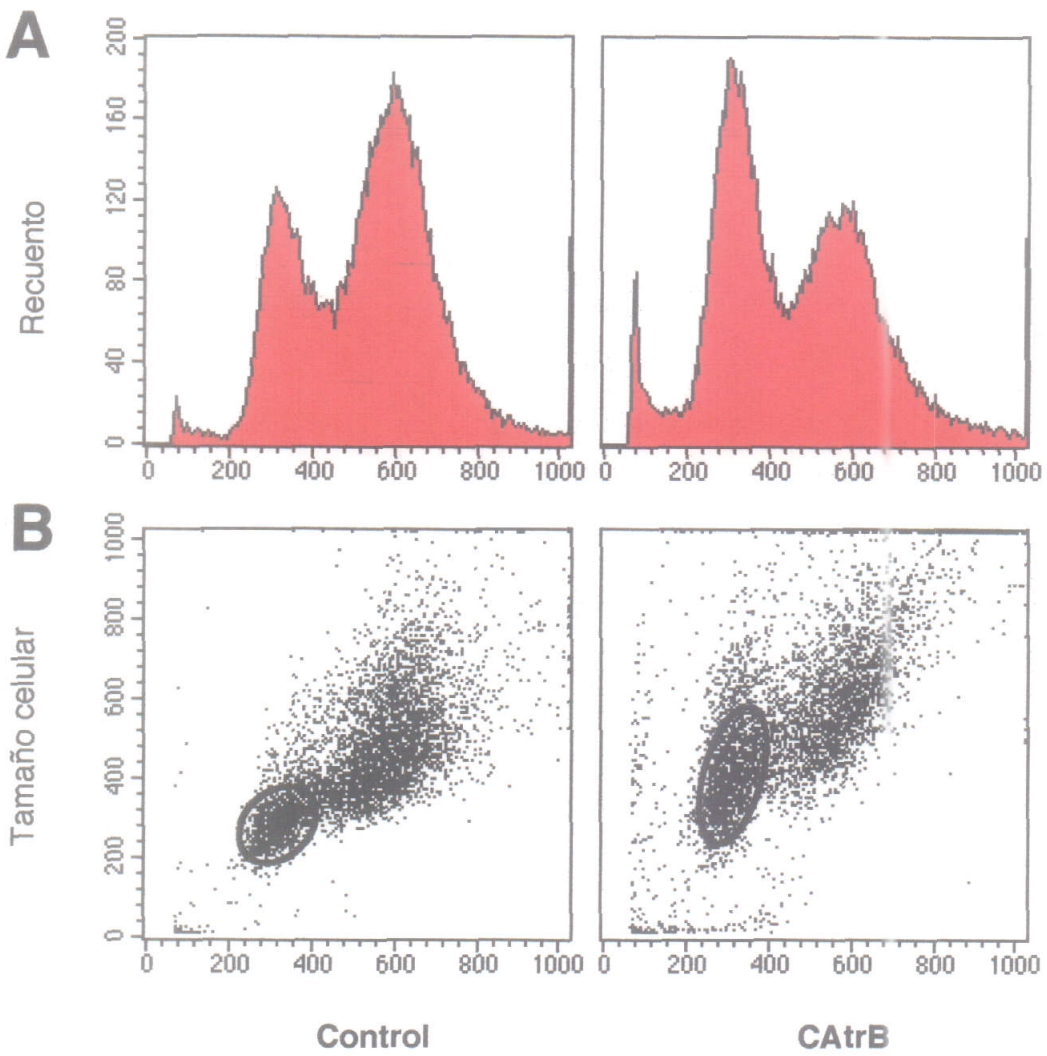


Figura 31. Contenido relativo de DNA.

### 3.4. Estudio del mutante SS10.

Tras la caracterización molecular del mutante SS2 (*cnb1*), se procedió al análisis de la estirpe mutante SS10. El grado de sensibilidad de las células SS10 a sodio y litio era alto y muy similar al del mutante *cnb1* ( $IC_{50} \approx 0.1$  M NaCl y  $\approx 15$  mM LiCl; ver Tabla 5). Además, su sensibilidad a pH alcalino sugería un defecto en la expresión del gen *ENAI*. Finalmente, los ensayos de toma de litio indicaron una mayor acumulación de este catión en comparación con células silvestres (Figura 32), prácticamente idéntica a la mostrada por un mutante *cnb1* (Figura 7). Al cabo de 1 hora en presencia de 30 mM LiCl y 1 mM KCl, el contenido en  $Li^+$  intracelular en las estirpes SS10 y SS2 (*cnb1*) era de aproximadamente 70 nmol  $Li^+$  / mg de peso seco. Las células control acumularon sólo 30-40 nmol  $Li^+$  / mg de peso seco (Figuras 7 y 32). Sin embargo, el diploide resultante de cruzar las estirpes SS2 (*cnb1*) y SS10 era resistente a NaCl (Figura 8), sugiriendo que la mutación presente en la estirpe SS10 no era alélica a la mutación *cnb1* de SS2 a pesar de las similitudes fenotípicas.

#### 3.4.1. Análisis de segregación de la mutación *nls2*.

El diploide resultante de cruzar SS10 con la cepa silvestre isogénica GRF167A mostró un nivel de tolerancia a NaCl similar al del parental silvestre (Tabla 6), indicando que la mutación presente en SS10 era recesiva. Mediante esporulación del diploide se aislaron segregantes haploides para los que se determinó su sensibilidad o resistencia a NaCl. De 39 segregantes analizados, 20 resultaron sensibles a 0.7 M de NaCl y 19 eran tolerantes. Esta proporción sensible/tolerante de 1:1 indicaba que la mutación que producía sensibilidad a NaCl en SS10 afectaba a un sólo gen, al que se denominó *NLS2*.

La tolerancia del diploide resultante de cruzar SS10 y SS2 fue similar a la de la cepa silvestre (Tabla 6 y Figura 8), indicando que la mutación en SS10 (*nls2*) no es alélica a la de SS2 (*cnb1*). Así mismo, el análisis fenotípico de 42 segregantes haploides aislados tras la esporulación del diploide obtenido por el cruce de las estirpes SS10 (*nls2*) y JP3-5b (*cnb1*) mostró una relación cercana a 3:1 entre segregantes sensibles y tolerantes a 0.7 M NaCl. Específicamente, 31 segregantes mostraron sensibilidad a NaCl y sólo 11 resultaron tolerantes. Estos datos son consistentes con una segregación independiente de las mutaciones *nls2* y *cnb1*.

Se obtuvo también un diploide tras cruzar JP5-9c (*nls2*) con RHW21 $\alpha$  (*enal-4*). La tolerancia a NaCl de este diploide fue similar a la del silvestre GRF167, indicando que *nls2* no es alélico a los genes *ENAI-4*. Sin embargo, el hecho de que el fenotipo de SS10 fuera muy similar al de los mutantes en calcineurina y *ENAI-4* sugería que la mutación *nls2* posiblemente marcara otro componente de la ruta de señales que regula la expresión del gen

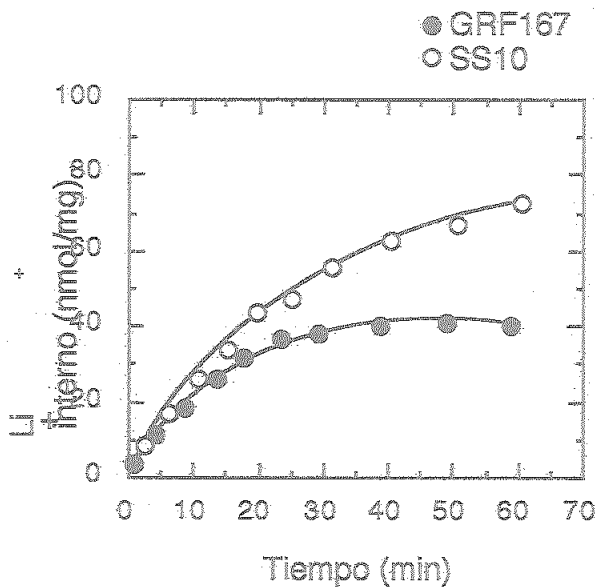


Figura 32. Acumulación de  $\text{Li}^+$  en las estirpes SS10 y GRF167. Células de la estirpe silvestre GRF167 (círculos) y mutante SS10 (cuadrados) se incubaron en medio AP suplementado con 1 mM KCl y 30 mM LiCl. Se tomaron muestras a los tiempos indicados, las células se recogieron por filtración y se determinó el contenido intracelular de litio por espectrofotometría de absorción atómica. Los valores se normalizaron respecto a peso seco de la muestra.

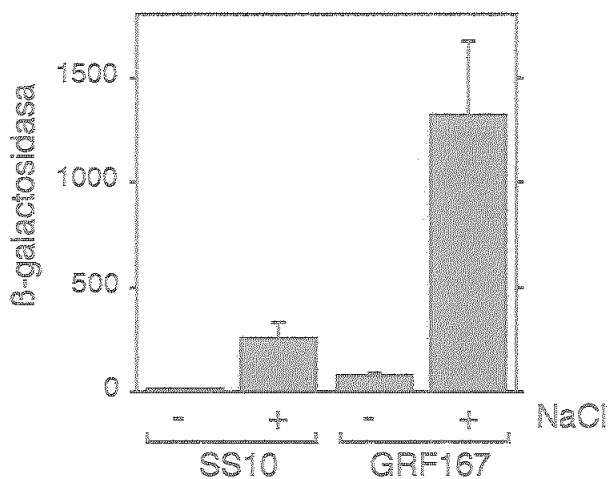
*ENAI*. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos en los que se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa en células control y en un mutante *nls2* que llevaban integrada la fusión *ENAI::LacZ* del plásmido FR70i. Como se observa en la Figura 33, la expresión de la construcción *ENAI::LacZ* en condiciones de estrés salino en un mutante *nls2* fue aproximadamente 5 veces menor que en el parental silvestre.

Por tanto, al igual que en un mutante calcineurina, la reducción en la tolerancia a  $\text{Na}^+$  del mutante *nls2* se puede explicar, al menos en parte, por una expresión reducida del gen *ENAI*. Esta coincidencia entre los fenotipos mutantes *nls2* y *cnb1* sugiere que la proteína NLS2 participa en la misma ruta reguladora que calcineurina.

### 3.4.2. Complementación del mutante *nls2*. Aislamiento del gen *YAP4*.

Para complementar la mutación *nls2* en SS10 se utilizó una genoteca de DNA total de la estirpe parental GRF167b en el plásmido multicopia YEp24. De 10300 transformantes primarios analizados, se seleccionaron 7 clones (T27, T28, T53, T67, T73, T91, T92) por su capacidad para crecer en medio YNB sólido conteniendo 1 M de NaCl. Los plásmidos aislados de estos transformantes se analizaron con enzimas de restricción. El análisis indicó que T27 y T28 contenían el mismo plásmido, al igual que T91 y T92. Además la digestión con EcoRI mostró que los 5 plásmidos (T27/28, T53, T67, T73 y T91/92) presentaban dos bandas comunes (4 y 2 kb), lo que sugería que todos podrían contener DNA de una misma región del cromosoma. Otra característica común a todos los plásmidos era su propensión a sufrir reordenamientos. Se eligió el plásmido de mayor tamaño, pT27 ( $\approx 18$  kb) para transformar al mutante SS10 y comprobar si se producía complementación de la sensibilidad a NaCl. Se comprobó que 5 de 6 transformantes habían recuperado la capacidad de crecer en NaCl. Probablemente el plásmido del transformante sensible había sufrido un reordenamiento por el que había perdido el gen responsable de la complementación. Se seleccionó el enzima de restricción BglII (que no tiene dianas en el vector YEp24) para dividir el plásmido pT27 en varios fragmentos, cuyos tamaños fueron:  $\approx 12$  kb,  $\approx 2.5$  kb,  $\approx 2$  kb, y  $\approx 1$  kb.

El fragmento de aproximadamente 12 kb resultante de la digestión de pT27 con BglII, y que incluye el vector YEp24 completo, se cerró mediante el enzima T4 DNA ligasa, dando un plásmido (pST2-4) que se utilizó para volver a transformar SS10. La sensibilidad a NaCl del transformante resultante resultó ser similar a la del mutante *nls2*, indicando que el gen responsable de la complementación no se encontraba en el inserto retenido. Los fragmentos restantes de la digestión de pT27 con BglII (de 2.5 kb, 2 kb y 1 kb), se subclonaron en el vector pRS416 y se secuenciaron aproximadamente 200 pares de bases de los extremos. Se compararon las secuencias obtenidas con el banco de datos GeneBank/EMBL. Se identificó



Cepas	Actividad β-galactosidasa	
	control	NaCl
SS10	9.67 ± 2.9	257.2 ± 70.7
GRF167	78.3 ± 16	1317.3 ± 351.6

Figura 33. La expresión del gen *ENAI* se reduce en el mutante SS10. Células de las estirpes GRF167 (silvestre) y SS10 (*nls2*) que llevan integrada la fusión *ENAI::LacZ* por transformación con el plásmido pFR70i, se incubaron en medio YPD suplementado o no con 0.5 M NaCl (+ ó -) durante 60 minutos. Se determinó actividad β-galactosidasa de extractos proteicos de dos transformantes independientes. En la Tabla se muestra la media y SE de los valores de actividad β-galactosidasa por mg de proteína, medidos según se indica en la sección 2.2.7. Se muestra experimento representativo de dos mediciones independientes.



así una región perteneciente al cromosoma XV que contiene los genes *YAP4* (factor de transcripción), *STII* (proteína tipo Heat-Shock) y parte del gen *BUB3* (proteína relacionada con el ciclo celular). Los fragmentos XhoI-HindIII de ≈1.3 Kb y HindIII-HindIII de ≈3.3 Kb, conteniendo respectivamente los genes *YAP4* y *STII* completos se subclonaron en el vector multicopia pRS426 (Figura 34). Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar SS10 y determinar su capacidad de conferir tolerancia a NaCl. Sólo los transformantes SS10 con el plásmido conteniendo *YAP4* resultaron tolerantes. Se concluyó por tanto que *YAP4* era el gen responsable de la complementación de la mutación *nls2*.

### 3.4.3. *YAP4* es un supresor de la mutación *nls2*.

La complementación del mutante *nls2* por *YAP4* sólo se había observado hasta el momento mediante la transformación del mutante con un plásmido multicopia que presumiblemente conducía a la sobreexpresión de *YAP4*. Para comprobar si *YAP4* se correspondía con la mutación *nls2* o era un supresor extragenético de ésta, se creó una cepa con el gen *YAP4* interrumpido. Se sintetizó por PCR un fragmento de DNA que contenía una secuencia correspondiente al gen *YAP4* del que se habían eliminado 597 pares de bases de la zona codificante, sustituyéndola por una secuencia de 1326 pb conteniendo el gen *HIS3* (Figura 35A). El fragmento XhoI-EcoRV del plásmido pYAP4-6 conteniendo la construcción *yap4::HIS3* se utilizó para transformar la cepa silvestre GRF167B de *S. cerevisiae* y se seleccionaron transformantes *HIS3*<sup>+</sup>. Para comprobar la disrupción del gen *YAP4* por recombinación homóloga se hizo una amplificación por PCR del locus *YAP4*, como se indica en la Figura 35B.

La disrupción de *YAP4* no afecta la viabilidad celular. Además, se comprobó que la tolerancia a 0.7 M NaCl de los disruptantes *yap4* era similar a la del silvestre GRF167, indicando que *YAP4* podría no ser el gen *NLS2* mutado en SS10. Para confirmar o descartar el alelismo entre *YAP4* y *NLS2* se cruzaron las estirpes JP11 (MAT $\alpha$ , *his3*, *ura3*, *yap4::HIS3*; tolerante a NaCl) y SS10 (MAT $\alpha$ , *his3*, *ura3*, *nls2*; sensible a NaCl), obteniéndose el diploide JP10. Se comprobó el fenotipo de sensibilidad a NaCl y auxotrofia para histidina de 162 segregantes haploides de JP10 con los resultados que se muestran en la Tabla 11. Si *YAP4* fuera el gen mutado *nls2*, la tolerancia a NaCl y la prototrofia para histidina estarían ligados, esto es, la mayoría de los segregantes *HIS3*<sup>+</sup> (de genotipo *yap4::HIS3*) serían tolerantes a NaCl mientras que los segregantes *his*<sup>-</sup> serían sensibles a NaCl. El hecho de que ambos marcadores (auxotrofia para histidina y sensibilidad a NaCl) segregaran independientemente uno de otro demostró un comportamiento no alélico entre *YAP4* y *NLS2*. Por tanto, se puede concluir que *YAP4* no es el gen *NLS2* mutado en SS10.

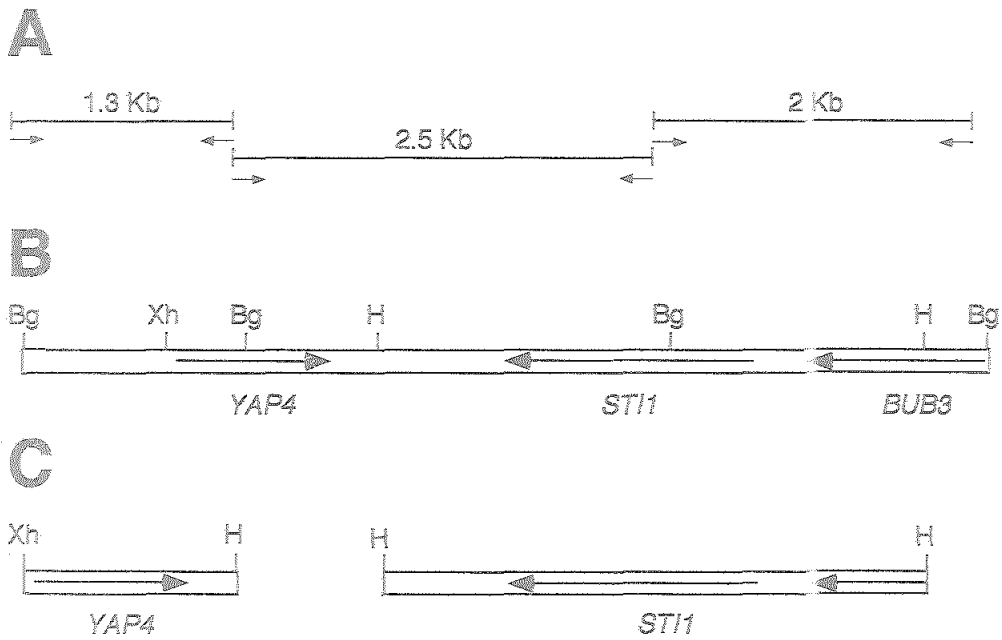
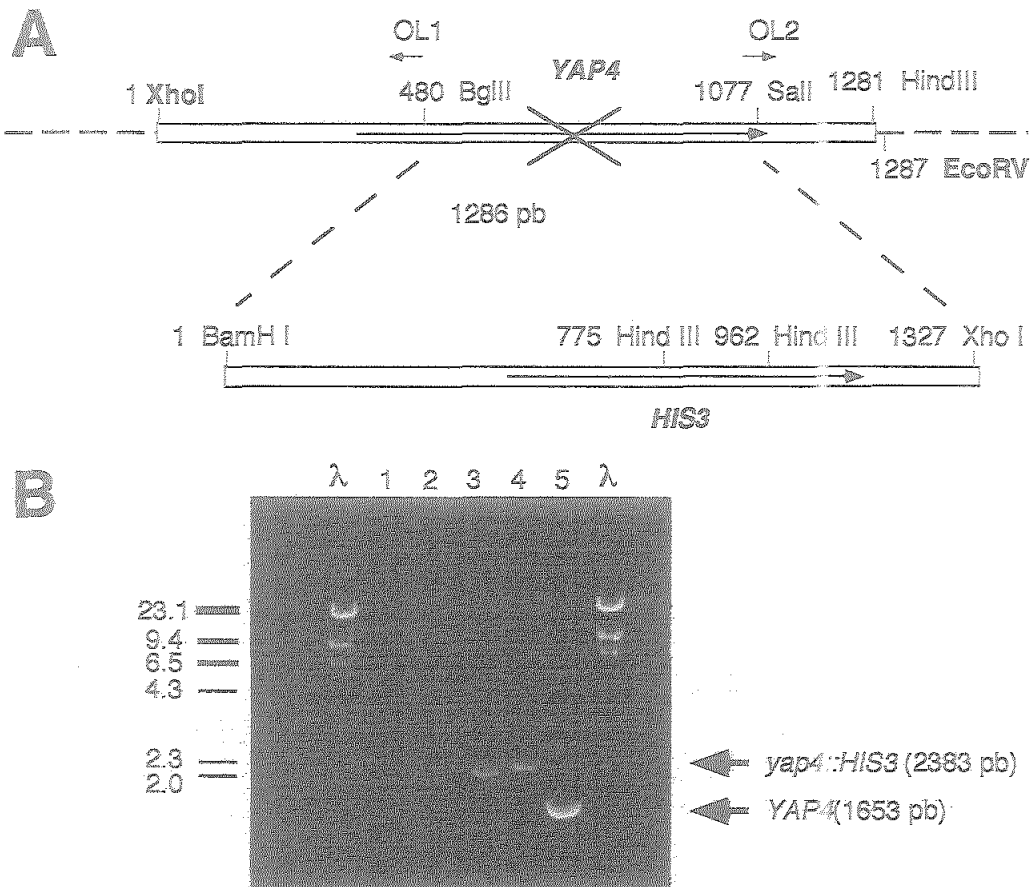


Figura 34. Identificación del gen *YAP4*. (A) Los fragmentos de 1.3, 2 y 2.5 kb resultantes de la digestión del plásmido pT27 con la endonucleasa de restricción BglIII se subclonaron en el vector pRS416 para su secuenciación. (B) Región del cromosoma XV correspondiente a los fragmentos BglIII descritos. Las flechas indican los marcos de lectura correspondientes a los genes *YAP4*, *STI1* y *BUB3*. (C) Se subclonaron separadamente en el vector pRS426 los fragmentos que contienen los genes *YAP4* y *STI1*. Se muestran los sitios de restricción relevantes (Bg, BglIII; H, HindIII; Xh, XhoI).



**Figura 35. Disrupción del gen *YAP4*.** (A) Mediante los oligonucleótidos divergentes CTTCCAGAAAGATCTGTA (*YAP4-OL1*) y ATTAAAGTCGACATTAAAAG (*YAP4-OL2*), se amplificó por PCR una región del plásmido pYAP4-3 que incluía el vector pSK, 286 pb del extremo 5' y 20 pb del extremo 3' del marco de lectura de *YAP4*. Los oligonucleótidos incluían las dianas BglIII y Sall para permitir la inserción de un fragmento BamHI/XhoI que contenía el gen *HIS3*. Se obtuvo así el plásmido pYAP4-6 que contenía la disrupción *yap4::HIS3*, en la que se había eliminado una región interna de 597 pb del gen *YAP4*. Mediante digestión del plásmido con las endonucleasas de restricción EcoRV y XhoI (en negritas) se liberó un fragmento de  $\approx 2$  kb que se utilizó para transformar cepas silvestres y obtener disruptantes  $\Delta yap4$ . (B) Para comprobar que se había producido la disrupción del gen *YAP4* en los transformantes *HIS*<sup>+</sup> obtenidos, se utilizaron los oligonucleótidos AACTAGGAGCAGAAGGCGAG (*YAP4-OL6*) y CCGGA ACTCTCCTTAGAAAC (*YAP4-OL7*), que amplifican un fragmento de  $\approx 1.6$  kb si *YAP4* está completo, o de  $\approx 2.38$  kb si está interrumpido por *HIS3*. En la foto se muestra el gel de agarosa en el que se resolvieron los fragmentos amplificados por PCR usando como molde DNA total de cuatro transformantes *HIS*<sup>+</sup> independientes (1-4) y del control silvestre GRF167b (5).

### 3.5. YAP4 es un factor de transcripción de la familia bZip.

El gen *YAP4* codifica una proteína de 295 aminoácidos (32,954 dalton) con una homología significativa con factores de transcripción de tipo bZip, como Yap1 y Yap2/Cad1, y con otras 5 las proteínas similares identificadas durante la secuenciación sistemática del genoma de la levadura (Figura 36) (Fernandes *et al.*, 1997). Las proteínas Yap de *S. cerevisiae* pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción AP-1 (Fernandes *et al.*, 1997). En Yap1 y Yap2/Cad1, la región básica y la disposición de leucinas son amino-terminal, mientras que los dominios equivalentes en Yap4 están localizadas en el extremo carboxilo. En general, la topología y tamaño de Yap4 se parecen más a las de Gcn4, otra proteína bZip de *S. cerevisiae* que regula la producción de enzimas relacionadas en la biosíntesis de aminoácidos, pero la identidad entre los dominios conservados de estas dos proteínas bZip es de sólo del 26%. La proteína con mayor similitud a Yap4 es Ydr259. Las dos proteínas son 86% idénticas en la región básica de unión a DNA y 44% en el dominio de dimerización. Teniendo en cuenta las similitudes estructurales y homología de secuencias entre Yap4, Ydr259 y proteínas bZip caracterizadas como Yap1, Yap2 y Gcn4, se puede concluir que Yap4 y Ydr259 son reguladores transcripcionales de la superfamilia bZip.

### 3.6. YAP4 es un supresor de la mutación en calcineurina.

Además de suprimir la mutación *nls2*, la sobreexpresión de *YAP4* reducía la sensibilidad a NaCl y LiCl de un mutante *cnb1* (Figura 37). Por tanto, *YAP4* también actúa como supresor de la mutación calcineurina. En un experimento de tipo dosis-respuesta, la presencia del gen *YAP4* en un plásmido multicopia aumentó la tolerancia de células *nls2* y *cnb1* hasta valores semejantes a los de células silvestres. Además, *YAP4* también potenció la resistencia a NaCl de las células silvestres.

Como se demostró anteriormente, la sensibilidad a NaCl del mutante calcineurina se debe a una expresión reducida del gen *ENAI* (que se traduce en una reducción en la expulsión de sodio), y a un defecto en el cambio de baja a alta afinidad en la toma de potasio mediada por el sistema *TRK1,2*. Para comprobar si la supresión del fenotipo de sensibilidad de calcineurina por *YAP4* tenía relación con la actividad de alguno de estos dos sistemas transportadores dependientes de calcineurina, se sobreexpresó *YAP4* en estirpes carentes de los genes *ENAI-4*, el gen *TRK1*, o los dos a la vez. Todas las estirpes incluían además una mutación *cnb1* para poder analizar su supresión por *YAP4*. Como se muestra en la Figura 38, *YAP4* aumentó más de 4 veces la tolerancia de las células con los genes *ENAI-4* funcionales, pero con una actividad reducida debido a la mutación *cnb1*, independientemente de la presencia o ausencia de *TRK1*. Los valores de IC<sub>50</sub> fueron de ≈30 mM NaCl para las

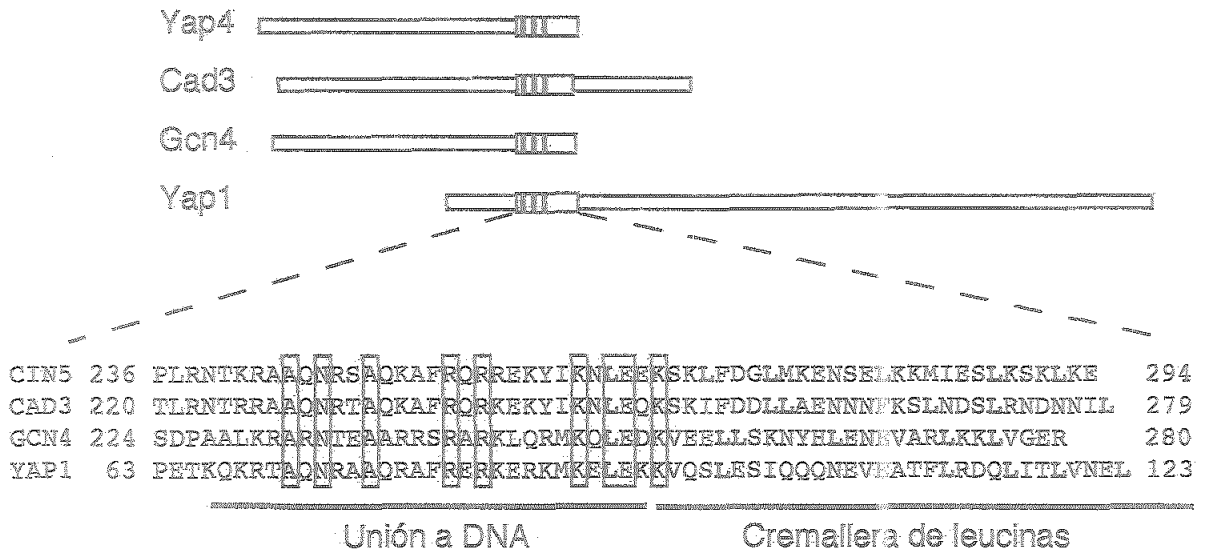
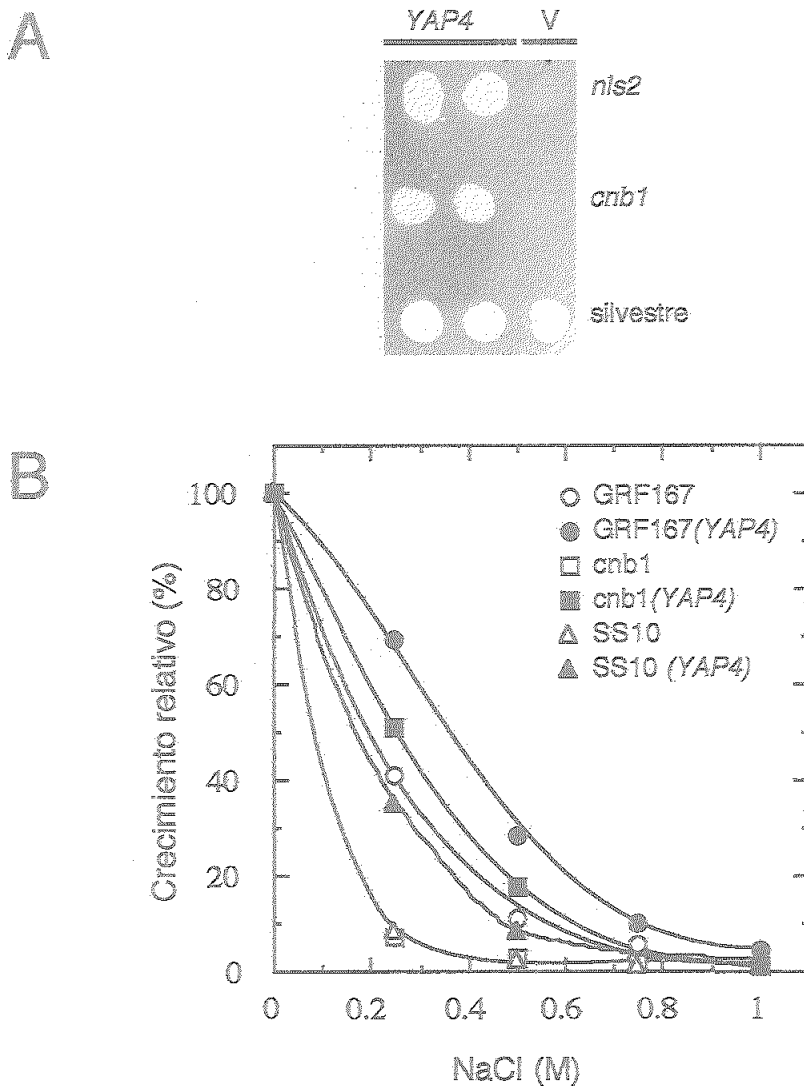


Figura 36. Similitud entre la proteína Yap4 y otras proteínas de tipo bZIP. Las barras superiores representan las proteínas Yap4, Cad3/Ydr259, Gcn4 y Yap1. Las longitudes de las barras son proporcionales al tamaño de las proteínas y se alinean en relación a los dominios de unión a DNA y dimerización, representados como cajas. Los aminoácidos idénticos en estos dominios para todos los polipéptidos se representan como bandas dentro de las cajas. Debajo se muestran las secuencias de aminoácidos correspondientes a los supuestos dominios de unión a DNA y de dimerización mediante la cremallera de leucinas. Los aminoácidos idénticos se muestran enmarcados y los residuos de leucina que conforman la cremallera se muestran en negrita.



**Figura 37. La sobreexpresión de YAP4 reduce la sensibilidad a NaCl de los mutantes sensibles SS2 y SS10, y aumenta la tolerancia del silvestre GRF167. (A)** La estirpe GRF167b y los derivados isogénicos SS10 (*nls2*) y JP20 (*cnb1*) se transformaron con el plásmido pYAP4-1 y con un vector vacío (V). Los transformantes se crecieron en medio líquido YNB hasta  $DO_{600} \approx 0.4$ . Se tomaron  $2.5 \mu\text{l}$  de cada cultivo y se sembraron en medio sólido YPD suplementado con 0.5 M NaCl. La placas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 5 días. **(B)** Curva dosis-respuesta de GRF167b (círculos) y mutantes isogénicos *cnb1* (cuadrados) y *nls2* (triángulos) transformados con pYAP4-1 (símbolos sólidos) o con un vector vacío (símbolos huecos). Las células se inocularon en medio mínimo YNB suplementado con las concentraciones indicadas de NaCl y se midió la  $DO_{600}$  después de 20 horas de incubación. Los datos se presentan como porcentajes en relación con los valores de  $DO_{600}$  en medio sin NaCl.

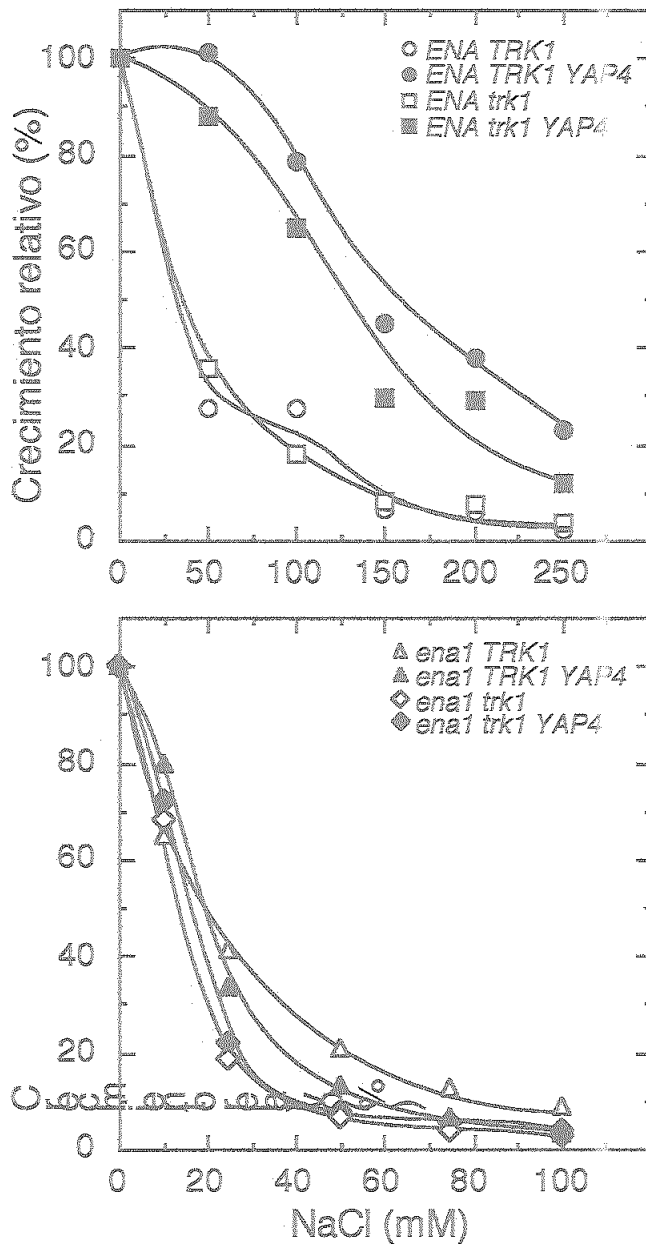


Figura 38. El incremento de tolerancia a NaCl por sobreexpresión de YAP4 depende de ENA1. Células de las estirpes JP14 (*ENA TRK1 cnb1*) (círculos), JP19 (*ENA trk1 cnb1*) (cuadrados), JP18 (*ena TRK1 cnb1*) (triángulos), y JP21 (*ena trk1 cnb1*) (rombos), transformadas con pYAP4-1 (símbolos sólidos) o un vector vacío (símbolos huecos), se crecieron durante 24 horas en medio mínimo AP con 0.5 mM KCl y cantidades crecientes de NaCl como se indica en las gráficas. Los datos se refieren a la DO<sub>600</sub> final que se obtuvo en relación al valor sin sal, como porcentajes. Los valores representados son la media de dos experimentos con transformantes independientes.

células con niveles normales de la proteína Yap4 y  $\approx 130$  mM después de transformar con el plásmido pYAP4-1. Sin embargo, *YAP4* no tenía ningún efecto en células en las que se habían eliminado los genes *ENAI-4*. Estos resultados indican que los genes *ENAI-4* median la supresión por *YAP4* de la sensibilidad a NaCl de los mutantes *cnb1*.

Los mutantes *cnb1* y *nls2* tienen comprometida la expresión del gen *ENAI* y en consecuencia acumulan  $\text{Li}^+$  en mayor medida que células silvestres. Para correlacionar la capacidad de Yap4 de suprimir las mutaciones *cnb1* y *nls2* con la corrección de este defecto, se midió la velocidad de acumulación neta de  $\text{Li}^+$  en células *cnb1* y *nls2* transformadas o no con el plásmido pYAP4-1. En ambos mutantes, la sobreexpresión de *YAP4* redujo la acumulación de iones  $\text{Li}^+$  (Figura 39). Por el contrario, medidas de transporte de  $\text{Li}^+$  en cepas carentes de *ENAI-4* o *TRK1* no mostraron un efecto significativo de Yap4, confirmando los resultados de tolerancia a NaCl.

### 3.6.1. Yap4 transactiva la expresión del gen *ENAI*.

Yap4 es un factor de transcripción cuya sobreexpresión suprime la sensibilidad a NaCl de un mutante calcineurina. Como se demostró más arriba, esta supresión sólo tiene lugar en presencia de los genes *ENAI-4*, lo que indica que Yap4 debe actuar en la transactivación de alguno de los genes *ENA*, probablemente de *ENAI*, cuya expresión está disminuída en un mutante calcineurina y el mutante *nls2*. En un experimento se comparó la tolerancia a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y pH alcalino de los mutantes *ena1* y *ena2-4* transformados con el plásmido pYAP4-8. Como puede verse en la Figura 40, el incremento de tolerancia debido a la sobreexpresión de Yap4 sólo tuvo lugar en presencia de un gen *ENAI* funcional. La presencia o ausencia de los otros genes del tándem no tuvo ningún efecto. Por tanto, Yap4 parece actuar únicamente sobre el gen *ENAI*, no teniendo ningún efecto sobre los otros genes *ENA*.

La hipótesis más plausible sobre la función de Yap4 en relación a tolerancia a cationes alcalinos es que Yap4 funciona como factor de transcripción que transactiva *ENAI* en respuesta a estrés por sal. Para comprobar esta hipótesis se midió la expresión de *ENAI* en cepas que contienen la fusión *ENAI::LacZ* y que sobreexpresan *YAP4*. Como se observa en la Figura 41, la sobreexpresión de *YAP4* en células silvestres y mutantes *cnb1* aumenta la expresión del gen reportero *ENAI::LacZ*, tanto en ausencia como en presencia de NaCl. Por tanto, se puede concluir que Yap4 transactiva *ENAI*. La sobreexpresión de *YAP4* aumenta los niveles de expresión de *ENAI* aún en ausencia de calcineurina, aumentando la tolerancia a NaCl.



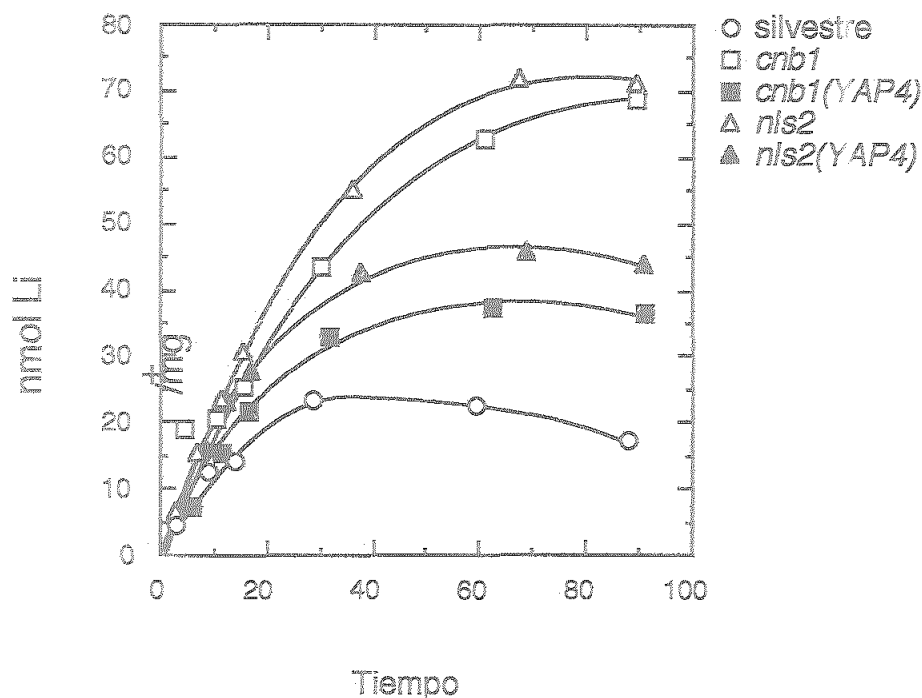


Figura 39. La sobreexpresión de *YAP4* redujo la acumulación de  $\text{Li}^+$  de los mutantes *cnb1* y *nls2*. Células de las estirpes SS10 (*nls2*) (triángulos) y la estirpe deficiente en calcineurina JP20 (*cnb1*) (cuadrados) que sobreexpresan la proteína Yap4 (símbolos sólidos) o no (símbolos huecos), y la estirpe silvestre DBY746 (círculos) se recogieron durante el crecimiento exponencial en medio líquido YNB y se transfirieron a tampón MES/ $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM KCl. Después de la adición de LiCl a una concentración final de 30 mM, se tomaron muestras a los intervalos indicados, se recogieron las células por filtración, y se determinó el contenido de  $\text{Li}^+$  intracelular. Se repitió el experimento dos veces con resultados similares. Se muestra experimento representativo.

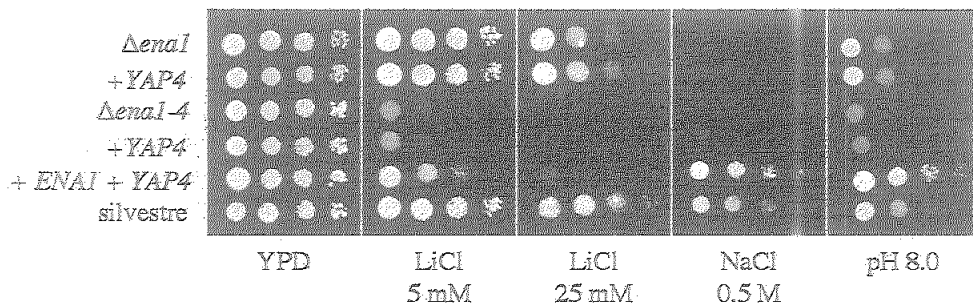
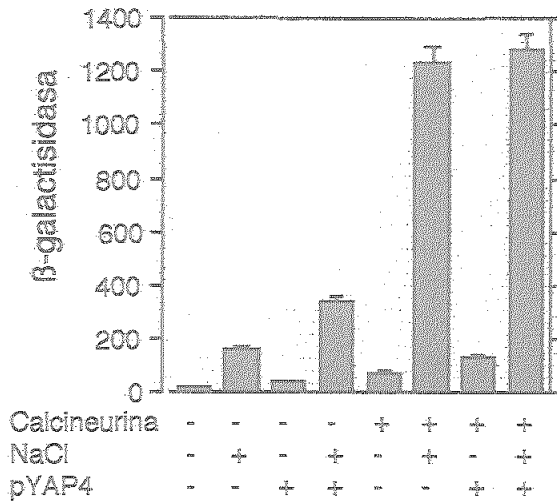


Figura 40. El incremento de tolerancia a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y pH alcalino por sobreexpresión de *YAP4* depende de *ENAI* y no de los otros genes del tándem. Células de las estirpes DB7H (*enaI::HIS3*), RH16 (*enaI-4::HIS3*) y RH16 conteniendo el gen *ENAI* en un vector monocopia (plásmido pGB34), se transformaron con pYEP4-8 ó un vector vacío y se crecieron en medio líquido YNB hasta una  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas de los cultivos y sembraron gotas de  $2.5 \mu\text{l}$  en placas con medio YPD (pH 6.0) conteniendo  $\text{LiCl}$  ó  $\text{NaCl}$  a las concentraciones indicadas, o en medio YPD tamponado a pH 8 con 100 mM Tris/MES. Las placas con litio se incubaron 2 días a  $30^\circ\text{C}$ ; las que contienen  $\text{Na}^+$ , o un pH de 8.0, durante 5 días.

A



B

Cepas	Actividad β-galactosidasa	
	control	NaCl
<i>cnb1</i>	24.49±5.38	163.96±42.90
<i>cnb1</i> + pYAP4	42.53±24.49	342.96±29.12
<i>CNB1</i>	78.32±16.10	1228.20±430.60
<i>CNB1</i> + pYAP4	135.52±73.60	1280.70±166.90

Figura 41. Incremento en la expresión de *ENAI* en células que sobreexpresan Yap4. (A) Representación de la actividad β-galactosidasa medida en 20 μg de extracto total de proteínas de las cepas SS2 (*cnb1*) y GRF167 (silvestre) que llevan integrada la fusión *ENAI::LacZ* y transformadas con el plásmido pYAP4-7 o con el vector vacío. Las células se crecieron en medio líquido YNB durante la noche, se diluyeron en medio líquido YPD a una  $DO_{600}$  de 0.25 y se crecieron hasta  $DO_{600} \approx 1.0$ . Los símbolos + y - indican presencia o ausencia del gen calcineurina, sobreexpresión o no de *YAP4*, y si las células fueron tratadas o no con 0.5 M NaCl durante 1 hora. (B) Los valores de actividad β-galactosidasa se expresan en unidades arbitrarias según la fórmula descrita en la sección 2.2.7. Estos valores son el promedio de tres transformantes independientes de cada cepa.

### 3.6.2. *YAP4* interviene en la homeostasis de $Mn^{2+}$ .

*Pmr1* es un transportador de iones perteneciente a las ATPasas de tipo P que participa en el metabolismo de  $Ca^{2+}$  y en la homeostasis de iones  $Mn^{2+}$ . Células carentes de un gen *PMRI* funcional acumulan niveles elevados de  $Mn^{2+}$  intracelular y son extremadamente sensibles a la toxicidad del ión  $Mn^{2+}$  (Lapinskas *et al.*, 1995). Las células deficientes en calcineurina son también sensibles a iones  $Mn^{2+}$  porque la expresión de *PMRI* se induce en respuesta a niveles elevados de  $Mn^{2+}$  por un mecanismo dependiente de calcineurina (Farcasanu *et al.*, 1995; Cunningham y Fink, 1996). Para comprobar si *YAP4* también afecta a la expresión del gen *PMRI*, se determinó la tolerancia a  $Mn^{2+}$  de mutantes calcineurina que sobreexpresaban *YAP4*. Como se muestra en la Figura 42, *Yap4* suprimió la sensibilidad a  $Mn^{2+}$  de un mutante calcineurina, pero no de un mutante *pmr1*, indicando que, como ocurre con *ENA1* y tolerancia a  $Na^+$ , el incremento de tolerancia a  $Mn^{2+}$  se debía a la presumible activación por *Yap4* de la expresión de *PMRI*. Para comprobar esto se midió la expresión del gen *PMRI* en cepas que contienen la fusión *PMRI::LacZ*. Como se indica en la Figura 43, la sobreexpresión de *YAP4* produce un incremento en la expresión de *YAP4* en el silvestre GRF167 cuando se induce con 5 mM de  $Mn^{2+}$ . En el mutante  $\Delta cnb1$ , sin embargo, la sobreexpresión de *YAP4* parece aumentar ligeramente los niveles basales de expresión de *PMRI*, pero no su inducción en presencia de  $Mn^{2+}$ . Al igual que lo ocurrido con  $Na^+$  y  $Li^+$ , la sobreexpresión de *YAP4* en células silvestres produjo un aumento de tolerancia a  $Mn^{2+}$ , mientras que la disrupción de *YAP4* no conllevó un aumento en la sensibilidad (resultados no mostrados).

### 3.6.3. *Yap4* transactiva *ENA1* por un mecanismo dependiente de la ruta calcineurina. Su función es independiente de *Tcn1/Crz1*.

*Yap4* es un factor de transcripción de tipo bZip que transactiva *ENA1* y *PMRI*, dos genes cuya activación transcripcional depende de calcineurina. En ausencia de calcineurina la expresión de *ENA1* y *PMRI* está disminuída, pero la sobreexpresión de *YAP4* suprime parcialmente este fenotipo, lo que sugiere que *YAP4* puede mediar la activación transcripcional dependiente de calcineurina. Sin embargo, la disrupción de *YAP4* no da lugar a un fenotipo de sensibilidad a iones  $Na^+$  o  $Mn^{2+}$ , por lo que deben existir otros factores de transcripción alternativos que expliquen la expresión de *ENA1* y *PMRI* dependiente de calcineurina en ausencia de *Yap4*.

Matheos *et al.* (1997) y Stathopoulos *et al.* (1997) describieron a *Tcn1/Crz1*, como un factor de transcripción necesario para la inducción dependiente de calcineurina de los genes *PMCI*, *PMRI*, *ENA1* y *FKS2*. A diferencia de *YAP4*, *TCN1* es esencial para la expresión génica y su disrupción produce sensibilidad a sodio, litio y manganeso (Stathopoulos *et al.*,

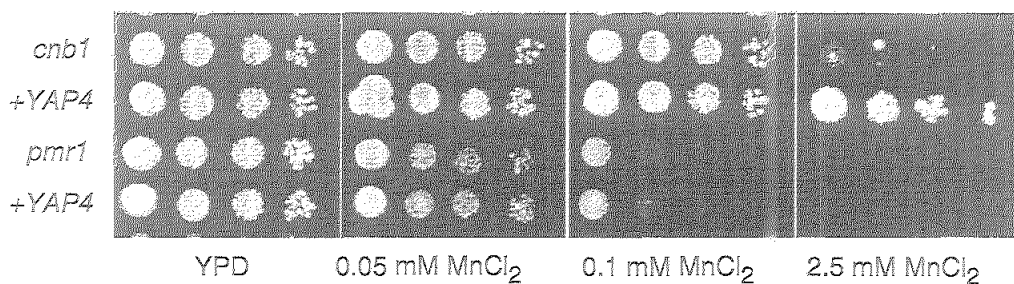


Figura 42. El incremento de tolerancia a  $Mn^{2+}$  del mutante *cnb1* por sobreexpresión de *YAP4* depende del gen *PMR1*. Células de las estirpes SS2 (*cnb1*) y JP36 (*pmr1*) transformadas con pYAP4-1 o con un vector vacío se crecieron en medio líquido YNB hasta una  $DO_{600}$  de  $\approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de 2.5  $\mu l$  en medio YPD al que se había añadido  $MnCl_2$  a las concentraciones indicadas. Las fotos se tomaron después de incubar las placas a 30°C durante 2 días.

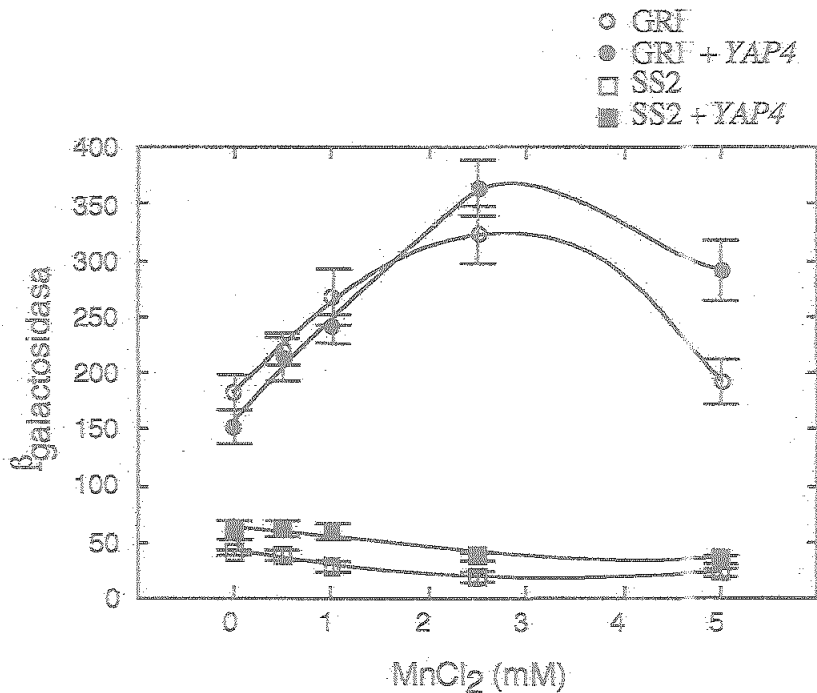


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de *YAP4* en la expresión del gen *PMRI*. Células de la estirpe silvestre GRF167 y el mutante SS2(*cnb1*) se transformaron con el plásmido pKC199 que contiene la fusión *PMRI::LacZ*, y con el plásmido pYAP4-7, plásmido multicopia que contiene *YAP4* completo. Se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa de células enteras permeabilizadas con cloroformo y después de inducir con distintas concentraciones milimolares de  $MnCl_2$  durante 4 horas. Los datos representan la media de 3 transformantes independientes. Se obtuvieron resultados similares cuando las células se trataron con 200 mM  $CaCl_2$ .

1997). En nuestro laboratorio se ha comprobado que la disrupción de *TCN1* también produce sensibilidad a pH alcalino, como se observa en la Figura 44. Para comprobar si la actividad transcripcional de Yap4 era dependiente de Tcn1/Crz1, se sobreexpresó *YAP4* en cepas *tcn1*. Como se puede observar en la Figura 45, Yap4 suprime la sensibilidad a sodio y manganeso de un mutante *tcn1*, indicando que ambos factores de transcripción actúan de forma independiente en la transactivación de los genes *ENAI* y *PMRI*.

Habiéndose establecido que Tcn1 es un factor de transcripción que media la expresión dependiente de calcineurina del gen *ENAI*, se podría postular que Yap4 es un factor accesorio, cuya actividad es adyuvante pero dispensable. Se hicieron experimentos de tolerancia para comprobar si en ausencia de Tcn1 la expresión de *ENAI* se hace dependiente de Yap4 en mayor medida. Como puede observarse en la Figura 44, el doble disruptante  $\Delta yap4 \Delta tcn1$  es ligeramente más sensible a sodio, litio y pH alcalino que  $\Delta tcn1$ . Este resultado sugiere que Yap4 tiene un papel accesorio en la transactivación de *ENAI* que sólo se manifiesta en ausencia de Tcn1. De la misma manera, el doble mutante  $\Delta yap4 \Delta tcn1$  es también algo más sensible a manganeso que el mutante  $\Delta tcn1$ , indicando que Yap4 participa en la transactivación de *PMRI*, pero en menor medida que Tcn1 (Figura 46).

#### 3.6.4. Yap4 transactiva *ENAI* de manera independiente a la ruta HOG.

Márquez *et al.* (1996) demostraron que el gen *ENAI* está regulado en su expresión durante estrés salino por la ruta de calcineurina y la ruta HOG. La contribución de cada una de estas rutas es dependiente de la concentración de sal en el medio. Así, la regulación por la ruta HOG es predominante a bajas concentraciones de NaCl (p.e. 0.3 M NaCl para el fondo genético W303), mientras que la ruta de calcineurina predomina a altas concentraciones de sal (p.e. 0.8 M para W303). Para ver una posible relación de Yap4 con la ruta HOG se realizaron análisis de epistasia entre la mutación *yap4* y mutaciones en intermediarios esenciales de la ruta HOG y determinar si los fenotipos de sensibilidad a NaCl eran aditivos.

Para la disrupción del gen *HOG1*, que codifica para la MAP kinasa de la ruta, se amplificó por PCR un fragmento de 2.1 kb del plásmido pJB1D que contiene la disrupción *hog1::TRP1* (Figura 47). El fragmento amplificado se usó para transformar las estirpes W303-1A y W303-1B, comprobándose el fenotipo de los transformantes *Trp1<sup>+</sup>* en 2 M sorbitol, condiciones en las que disruptante *hog1* es incapaz de crecer. Se obtuvieron así las cepa JP27 (MATa  $\Delta hog1$ ) y JP28 (MAT $\alpha$   $\Delta hog1$ ). Para ver si las mutaciones en *YAP4*, *HOG1* y *CNB1* tenían efectos aditivos, se construyeron cepas que combinaban dos de estas mutaciones. El doble mutante JP29 ( $\Delta cnb1 \Delta hog1$ ) se construyó mediante disrupción del gen *CNB1* en JP28 ( $\Delta hog1$ ) usando la construcción *cnb1::HIS3*. El doble mutante JP32 ( $\Delta yap4$

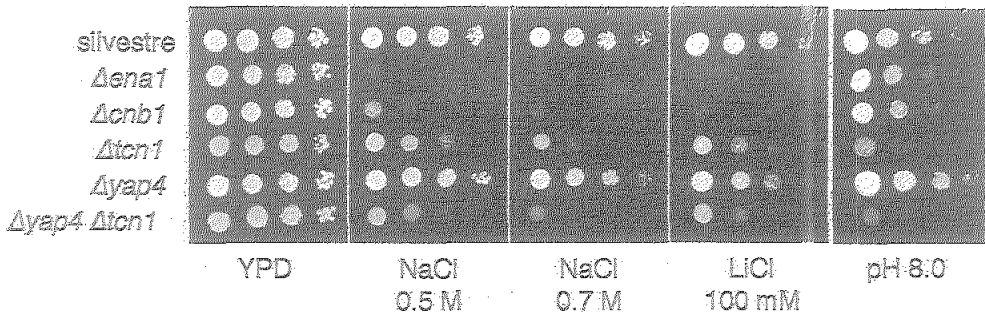


Figura 44. La disrupción del gen *YAP4* aumenta la sensibilidad a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y pH alcalino del mutante *tcn1*. Células de las estirpes W303-1A y los mutantes isogénicos G19 ( $\Delta ena1-4$ ), JP24 ( $\Delta cnb1$ ), DMY14 ( $\Delta tcn1$ ), JP26 ( $\Delta yap4$ ) y JP35 ( $\Delta yap4 \Delta tcn1$ ) se cultivaron en medio líquido YPD hasta una  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de  $2.5 \mu\text{l}$  en medio sólido YPD al que se añadió  $\text{NaCl}$  o  $\text{LiCl}$  a las concentraciones indicadas, o 100 mM Tris/MES a pH 8.0. Las placas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 2-3 días.



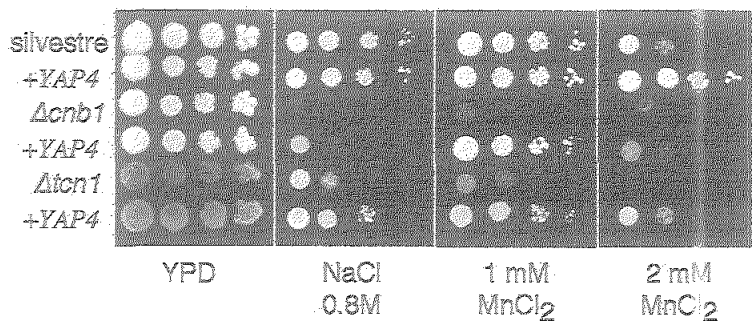


Figura 45. La sobreexpresión de *YAP4* aumenta la tolerancia a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$  del mutante *tcn1*. Células de las estirpes W303-1A, JP24 ( $\Delta\text{cnb1}$ ) y DMY14 ( $\Delta\text{tcn1}$ ), transformados con pYAP4.1 o un plásmido vacío se cultivaron en medio líquido YNB hasta una  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de  $2.5 \mu\text{l}$  en medio sólido YPD al que se añadió  $\text{NaCl}$  ó  $\text{MnCl}_2$  a las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 2-3 días.

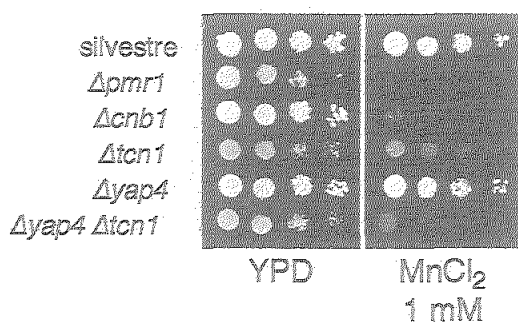
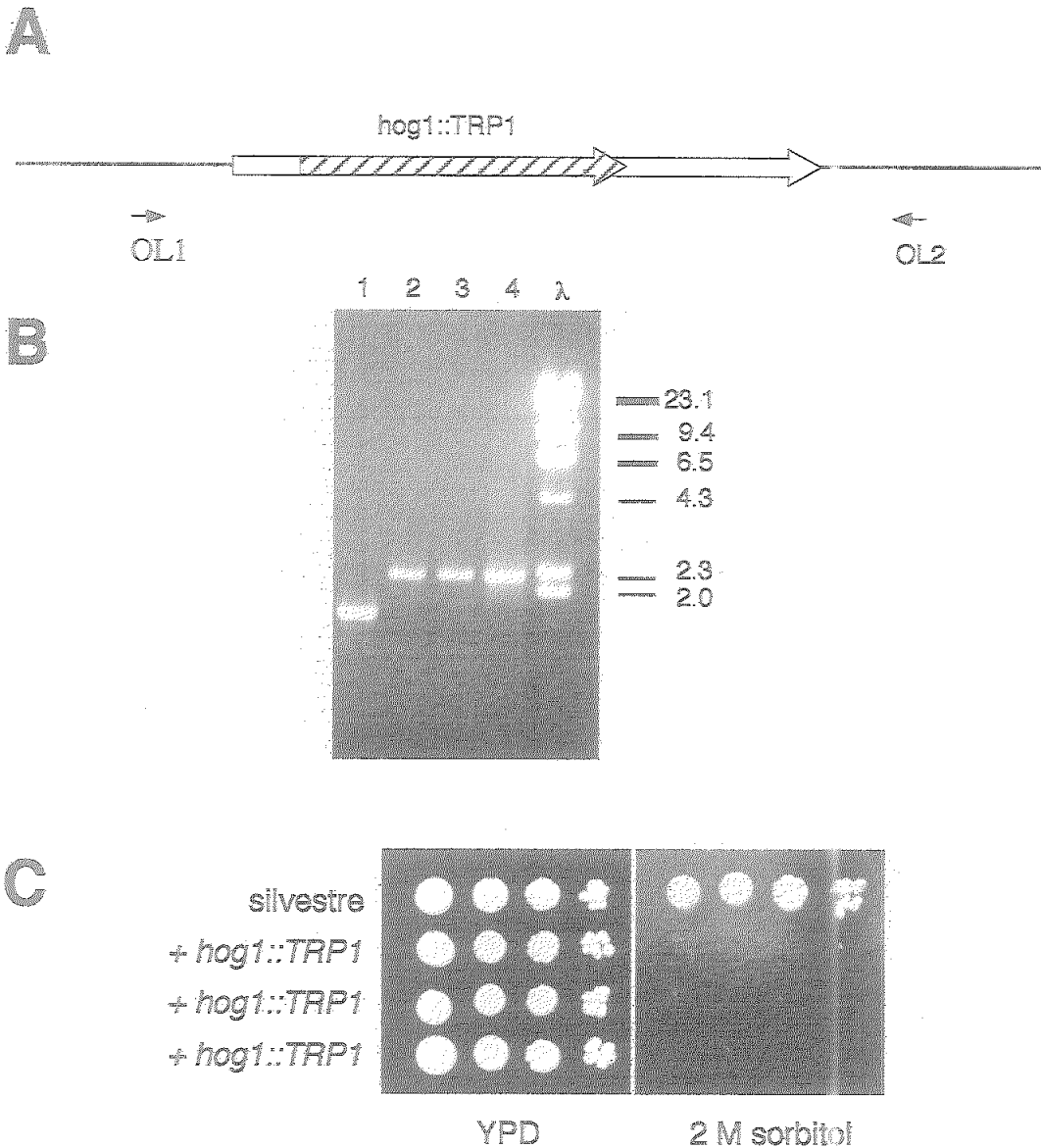


Figura 46. La disrupción del gen *YAP4* aumenta la sensibilidad a  $Mn^{2+}$  del mutante *tcn1*. Células de las estirpes W303-1A y los mutantes isogénicos JP40 ( $\Delta pmr1$ ), JP24 ( $\Delta cnb1$ ), DMY14 ( $\Delta tcn1$ ), JP26 ( $\Delta yap4$ ) y JP35 ( $\Delta yap4 \Delta tcn1$ ) se cultivaron en medio líquido YPD hasta una  $DO_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de  $2.5 \mu l$  en medio sólido YPD al que se añadió NaCl o LiCl a las concentraciones indicadas, o 100 mM Tris/MES a pH 8.0. Las placas se incubaron a  $30^\circ C$  durante 2-3 días.



**Figura 47. (A).** Disrupción del gen *HOG1*. Se usaron los oligonucleótidos OL1-HOG1 (GGCGGGCGTTATTATACGGG) y OL4-HOG1 (CATTAGCGTACTGTATGGCC) para amplificar un fragmento de 2.1 kb del plásmido pJB1D que contiene un gen *HOG1* (flecha blanca) interrumpido por el gen *TRP1* (flecha rayada). El fragmento amplificado con la disrupción *hog1::TRP1* se usó directamente para transformar cepas de levadura y obtener disruptantes  $\Delta hog1$ . **(B)** Se usaron los oligonucleótidos OL1-HOG1 y OL2-HOG1 (CATGATCGAAATACGTCCAC) para comprobar los disruptantes  $\Delta hog1$  entre los transformantes *TRP*<sup>+</sup> obtenidos. Se amplificó una banda de  $\approx 2.3$  kb de los disruptantes  $\Delta hog1$  (2 y 3) y de  $\approx 1.7$  kb del silvestre W303 (1). El carril 4 corresponde a la amplificación del vector pJB1D. **(C)** Células de la estirpe W303 y tres transformantes independientes con el fragmento *hog1::TRP1* se cultivaron primero en medio líquido YNB hasta una  $DO_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de  $2.5 \mu\text{l}$  en medio YPD sin y con 2M sorbitol. Las fotos se tomaron después de 4 días de incubación a  $30^\circ\text{C}$ .

$\Delta cnb1$ ) se obtuvo por cruzamiento de las cepas JP24 y JP26 (Tabla 2). Finalmente, el doble mutante JP34 ( $\Delta yap4 \Delta hog1$ ) se obtuvo mediante cruce de las cepas JP26 y JP27.

Se comparó la tolerancia a NaCl y LiCl de las cepas W303-1A, JP26 ( $\Delta yap4$ ), JP24 ( $\Delta cnb1$ ), JP28 ( $\Delta hog1$ ), JP32 ( $\Delta yap4 \Delta cnb1$ ), JP34 ( $\Delta yap4 \Delta hog1$ ) y JP29 ( $\Delta cnb1 \Delta hog1$ ). Como puede observarse en la Figura 48, la sensibilidad a sodio y litio del doble mutante  $yap4 cnb1$  es similar a la del mutante simple  $cnb1$ , por lo que parece probable que Yap4 participe en la transactivación de *ENAI* de una manera dependiente de calcineurina. Por el contrario, el doble mutante  $yap4 hog1$  parecía ligeramente más sensible a sodio y litio que un mutante  $hog1$ , indicando que los genes *YAP4* y *HOG1* intervienen de manera independiente en la transactivación de *ENAI*. Como se esperaba, la sensibilidad a sodio y litio provocadas por las mutaciones  $cnb1$  y  $hog1$  se suman, en concordancia con los resultados obtenidos por Márquez *et al.* (1996).

### 3.7. El gen *YDR259/CAD3* homólogo a *YAP4* es esencial para la tolerancia a $Cd^{2+}$ .

La proteína con mayor identidad con Yap4 es *Ydr259*, como ya se ha mencionado anteriormente. Las dos proteínas son 86% idénticas en la región básica de unión a DNA y 44% en el dominio de dimerización. En adelante se denominará *CAD3* al locus *YDR259*, ya que como se demuestra más abajo, es esencial en la tolerancia a cadmio. Se pensó en un principio que Cad3 podría tener una función redundante a la de Yap4, lo que explicaría la ausencia de un claro fenotipo de sensibilidad iónica en un mutante  $yap4$ . Según esta hipótesis, Yap4 y Cad3 son funcionalmente redundantes, de tal forma que la ausencia de uno de los dos no afectaría de manera significativa a la expresión de los genes *ENAI* y *PMR1*. Para comprobar esta hipótesis se amplificó por PCR un fragmento de DNA que contiene el gen *CAD3* y las regiones adyacentes, que se introdujo en el vector multicopia pRS426, obteniéndose el plásmido pCAD3-2.

Se utilizó este plásmido para transformar células  $cnb1$  y comprobar si *CAD3* también suprimía la sensibilidad a iones de un mutante en calcineurina. Como se observa en la Figura 49, el aumento de tolerancia a  $Na^+$ ,  $Li^+$  y  $Mn^{2+}$  en un mutante  $cnb1$  por sobreexpresión de *CAD3* fue muy pequeño comparado con *YAP4*. No obstante, Habría que tener en cuenta que la expresión de *YAP4* y *CAD3* está regulada por sus respectivos promotores y no se conoce el nivel de expresión de cada uno de ellos. Es posible que un menor nivel de expresión de *CAD3* explicara que su efecto sobre la tolerancia fuera menos significativo.

Para ver si la ausencia de *CAD3* producía una disminución en la tolerancia a iones se obtuvo un mutante en ese gen. Para ello se construyó el alelo nulo  $cad3::URA3$  como se

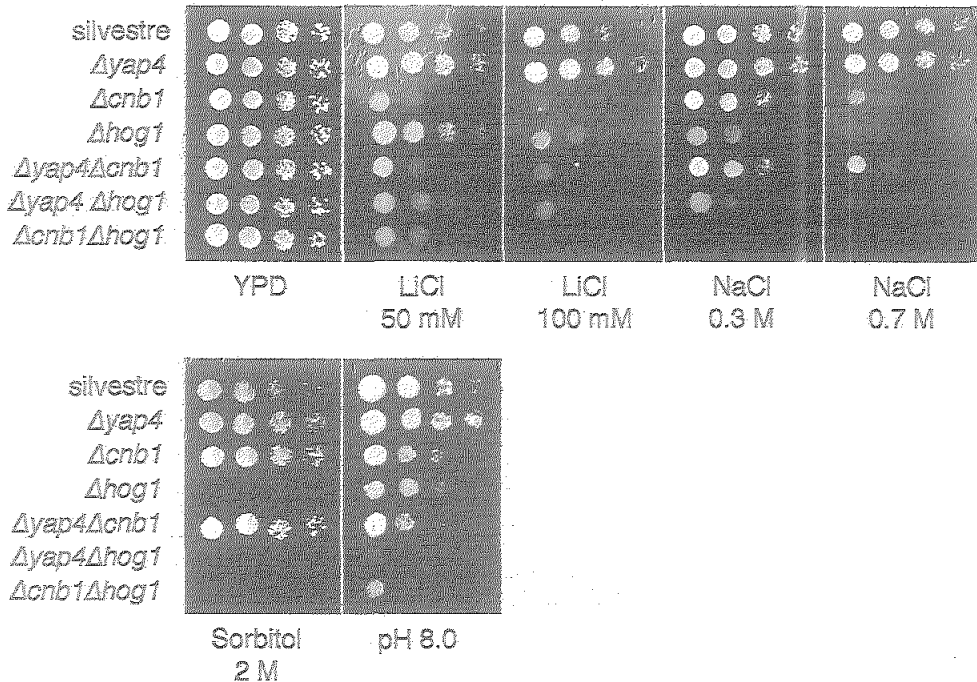


Figura 48. La disrupción de YAP4 aumenta la sensibilidad a  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y pH alcalino del mutante *hog1*. Células de la estirpe silvestre W303-1A, y mutantes JP26 ( $\Delta yap4$ ), JP24 ( $\Delta cnb1$ ), JP28 ( $\Delta hog1$ ), JP32 ( $\Delta yap4 \Delta cnb1$ ), JP34 ( $\Delta yap4 \Delta hog1$ ) y JP29 ( $\Delta cnb1 \Delta hog1$ ) se cultivaron en medio líquido YPD hasta  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de  $2.5 \mu\text{l}$  en medio sólido YPD al que se añadió  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ , sorbitol a las concentraciones indicadas, ó 100 mM Tris/MES a pH 8.0. Las placas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 2-3 días.

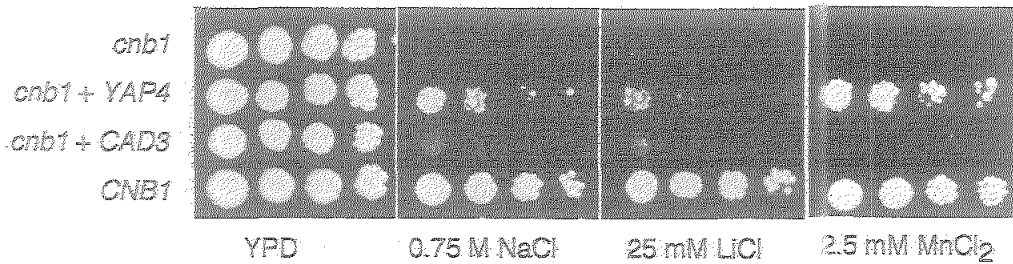
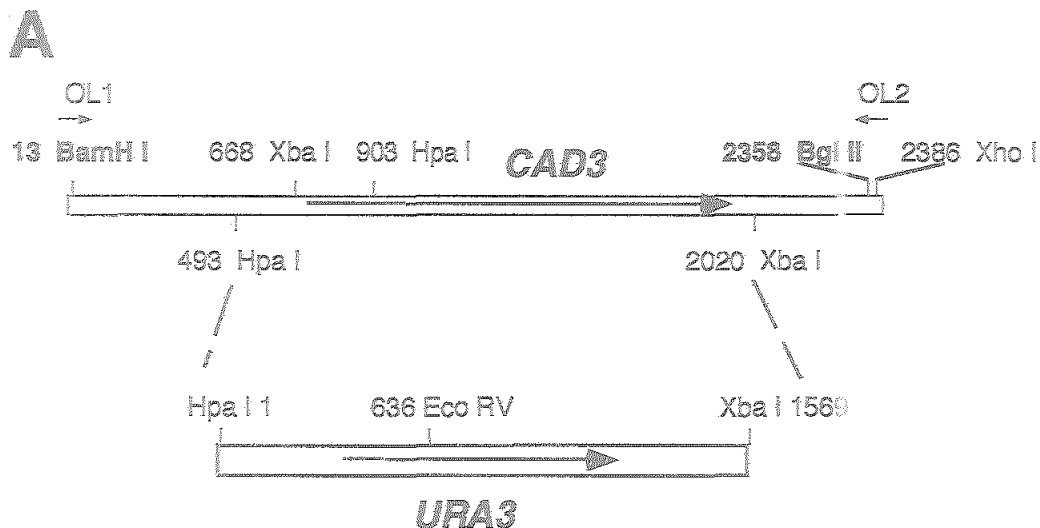
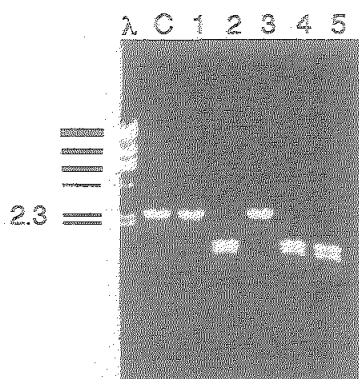


Figura 49. Efecto de la sobreexpresión de *CAD3* sobre la tolerancia a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  ó  $\text{Mn}^{2+}$  del mutante *cnb1*. Células de la estirpe JP20, ( $\Delta cnb1$ ), transformadas con los plásmidos pYAP4-1, pCAD3.2 ó vector vacío, y de la estirpe silvestre GRF167, se cultivaron en medio líquido YPD hasta  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron gotas de  $2.5 \mu\text{l}$  en medio sólido YPD al que se añadió  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$  o  $\text{MnCl}_2$  a las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 2-3 días.

indica en la Figura 50. Células de la estirpe GRF167 se transformaron con un fragmento de DNA que contiene *cad3::URA3*, obteniéndose el mutante *cad3* (JP12), viable y sin defectos visibles en el crecimiento. A continuación se cruzó este mutante JP12 (MAT $\alpha$  *cad3::URA3*) con el disruptante JP11 (MAT $\alpha$ , *yap4::HIS3*) para producir el diploide heterizigoto. Los resultados del análisis de 199 esporas procedentes de este diploide indicaron que el doble mutante *yap4 cad3* (JP13) era viable (Tabla 12). Para ver si la ausencia simultánea de los genes *YAP4* y *CAD3* afecta la tolerancia iónica, se comprobó el crecimiento de células JP13 (*yap4 cad3*) derivadas de cuatro esporas independientes con el mismo genotipo, en placas suplementadas con NaCl, LiCl y MnCl<sub>2</sub>. El nivel de sensibilidad de JP13 era similar al de los parentales, es decir igual al silvestre (Figura 51). Por tanto la disrupción de *YAP4*, *CAD3* o la doble mutación no tienen ningún efecto sobre la tolerancia a estas sales.

La falta de Yap4 y Cad3 no afecta al crecimiento en presencia de Na<sup>+</sup> o Mn<sup>2+</sup>. Para encontrar otras funciones de estas proteínas, se buscaron otras condiciones de crecimiento en las que la actividad de Yap4 ó Cad3 fuera esencial. Otros laboratorios han demostrado que otros miembros de la familia de proteínas Yap son necesarias en la tolerancia a ciertas drogas, metales o agentes oxidantes. Así por ejemplo niveles elevados de Yap1 ó Yap2/Cad1 producen resistencia pleiotrópica a drogas como cicloheximida y una mayor tolerancia a metales tóxicos como cadmio o cinc. Curiosamente la disrupción de *CAD1* no tiene efecto en la resistencia a cadmio, mientras que el mutante *yap1* es hipersensible a este metal (Wu *et al.*, 1993). También se ha comprobado que mutantes en los genes *YAP1* ó *YAP2* son sensibles a agentes oxidantes, en particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Stephen *et al.*, 1995). Para ver si Yap4 y Cad3 tenían una función similar a Yap1 y Yap2 se crecieron mutantes *yap4*, *cad3* y un doble mutante en presencia de metales (cinc, cadmio, cobre, cobalto), agentes oxidantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y drogas (cicloheximida). El crecimiento del mutante *yap4* era similar al silvestre en todos los casos. En cuanto al mutante *cad3*, su comportamiento era también igual al silvestre en todas las condiciones probadas a excepción del medio que contenía cadmio. Como se puede comprobar en la Figura 52 los disruptantes  $\Delta cad3$  eran muy sensibles a este metal. La tolerancia de los mutantes  $\Delta yap4$  y  $\Delta cnb1$  era similar al silvestre, por lo que ninguno de estos dos genes parecen estar relacionados con tolerancia a cadmio. Estos resultados indican que Cad3 funciona en los mecanismos de tolerancia a cadmio de manera independiente a calcineurina, y que Yap4 y Cad3 no son equivalentes funcionales ya que median resistencia a diferentes iones. Tampoco parece haber relación funcional entre Cad3 y las proteínas tipo bZip Yap1 y Yap2/Cad1, ya que el mutante *cad3* es sensible a cadmio pero no a cicloheximida o peróxido de hidrógeno a los cuales *yap1* y *yap2/cad1* son sensibles.

Para ver si altos niveles de Cad3 aumentaban la tolerancia a cadmio, se sembraron células de la cepa silvestre GRF167 transformadas con plásmido pCAD3-2 (gen *CAD3* amplificado por PCR en el vector multicopia pRS426) en medio sólido YPD al que se añadió CdCl<sub>2</sub> a una

**B**

**Figura 50. Disrupción del gen CAD3.** (A) Mediante los oligonucleótidos OL1-CAD3 (GGCGCTTTAGATGGATCCG) y OL2-CAD3 (TGGCTACTICGAGGTCTTGC), que incluyen las dianas de restricción BamHI y XhoI (subrayados) se amplificó por PCR un fragmento de ADN de  $\approx 2.4$  kb que contiene el gen *CAD3* completo. Para la sobreexpresión de *CAD3*, este fragmento se digirió con los enzimas de restricción BamHI y XhoI y se introdujo en el vector pRS426 cortado con los mismos enzimas, dando lugar al plásmido pCAD3-2. Para la disrupción del gen se substituyó el fragmento HpaI-XbaI, de 1.5 kb, que contiene el gen *CAD3*, por un fragmento que contiene el gen *URA3*, resultante de digerir el vector YEP352 con los enzimas HpaI y XbaI. El plásmido así construido, denominado pCAD3-5 se cortó con las endonucleasas de restricción BamHI y BglIII, liberándose un fragmento de 2.3 kb. Este fragmento se utilizó para transformar células de levadura y obtener disruptantes *cad3::URA3*. (B) Se utilizaron los mismos oligonucleótidos (OL CAD1-1 y CAD1-2) para comprobar si la disrupción *cad3::URA3* había tenido lugar en los transformantes *URA*<sup>+</sup> obtenidos. El tamaño del fragmento amplificado de un disruptante  $\Delta cad3$  era similar al del silvestre *CAD3* ( $\approx 2.4$  kb), pero sólo el primero contenía una diana EcoRV. La digestión con esta endonucleasa permitió identificar 3 disruptantes *cad3::URA3* (2, 4 y 5) de 5 transformantes *URA*<sup>+</sup> ensayados, ya que el fragmento amplificado se dividió en otros dos de  $\approx 1.3$  y  $\approx 1.1$  kb. C indica una copa silvestre (GRF167) usada como control.  $\lambda$  (digerido con HindIII) es el marcador del tamaño de las bandas.



Tabla 12. Análisis de esporas derivadas del diploide *yap4 x cad3*.

Segregantes	Número de esporas	Porcentaje
<i>YAP4, cad3::URA3</i>	54	27.1%
<i>yap4::HIS3, CAD3</i>	35	17.6%
<i>yap4::HIS3, cad3::URA3</i>	57	28.6%
<i>YAP4, CAD3</i>	53	26.6%

Células diploides resultantes del cruzamiento de las cepas JP11 (*MATa, yap4::HIS3*) y JP12 (*MAT $\alpha$ , cad3::URA3*) se sometieron a esporulación. Se germinaron las esporas en medio rico y posteriormente se transfirieron las células resultantes a placas conteniendo medio mínimo YNB, suplementado con histidina, uracilo, ambos o ninguno. De esta manera se identificaron las células que contenían la mutación *yap4::HIS3*, la mutación *cad3::URA3* y el doble mutante *yap4::HIS3 cad3::URA3*. En la primera columna se indica el genotipo de cada uno de los posibles segregantes. En la segunda columna se indica el número de esporas obtenidas de cada genotipo, de 199 tomadas al azar. En la tercera columna aparece el porcentaje de cada genotipo, próximo al 25% esperado en cada caso.

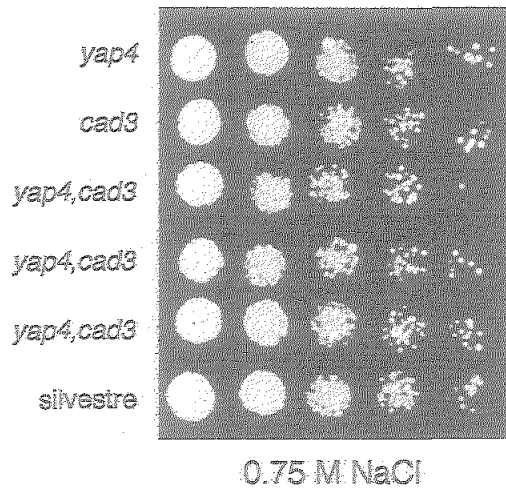
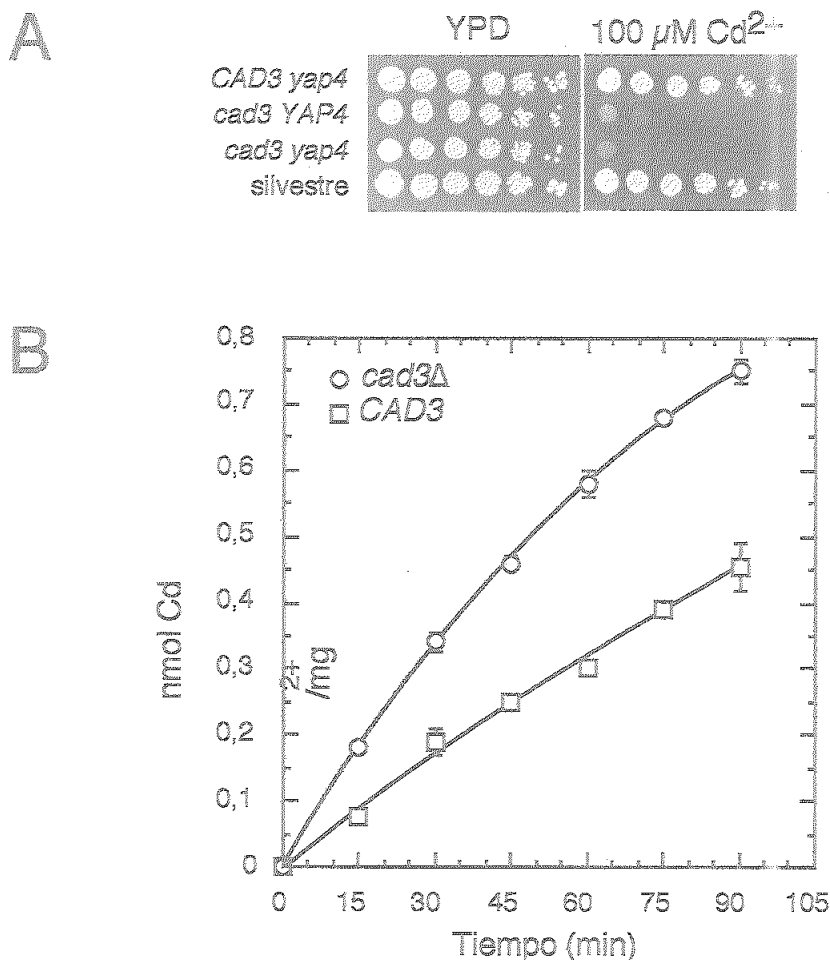


Figura 51. La mutación simultánea de los genes *YAP4* y *CAD3* no afecta la tolerancia a  $\text{Na}^+$ . Crecimiento de los mutantes  $\Delta yap4$ ,  $\Delta cad3$ , 3 dobles mutantes independientes  $\Delta yap4 \Delta cad3$  y silvestre GRF167 en medio sólido YPD suplementado con 0.75 M de NaCl. Se sembraron gotas de diluciones decimales de cultivos crecidos a  $\text{DO}_{600} \approx 1.0$ . Se obtuvieron resultados similares en medios suplementados con 50 mM LiCl ó 5 mM  $\text{MnCl}_2$ .



**Figura 52.** La mutación del gen *CAD3* aumenta la sensibilidad a Cd, observándose una mayor acumulación de este metal en el interior de las células. (A) Células de las estirpes JP11 (*CAD3 yap4*), JP12 (*cad3 YAP4*), JP13-1 (*cad3 yap4*), y GRF167 (*CAD3 YAP4*) se crecieron en medio líquido YPD. Se hicieron diluciones seriadas y se sembraron gotas de 2.5  $\mu\text{l}$  de células en medio sólido YPD suplementado con 100  $\mu\text{l}$   $\text{CdCl}_2$  y se incubaron durante 3 días a 28°C. (B) Entrada neta de  $\text{Cd}^{2+}$ . Células de las estirpes isogénicas JP12 (*cad3*) y GRF167 (*CAD3*) se crecieron en YPD a una densidad de  $\approx 2 \times 10^7$  cél/ml y se añadió  $\text{CdCl}_2$  de una solución concentrada para dar una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . A los intervalos indicados se tomaron muestras de células por filtración, se lavaron y se determinó el contenido intracelular de  $\text{Cd}^{2+}$  en un espectrofotómetro de absorción atómica. Los datos son la media y S.E. de dos cultivos de cada una de las estirpes.

concentración de hasta 200  $\mu\text{M}$ . A diferencia de lo que ocurre con Yap1 y Yap2/Cad1, la sobreexpresión de Cad3 no aumenta la tolerancia a cadmio de una levadura silvestre. La funcionalidad del gen *CAD3* amplificado por PCR se comprobó transformando al mutante *cad3* con el plásmido pCAD3-6, que contiene el gen *CAD3* en monocopia. Las células resultantes recuperaron la capacidad para crecer en presencia de niveles de cadmio similares a los tolerados por la cepa silvestre, demostrando que el gen *CAD3* sintetizado por PCR era activo.

Para investigar el mecanismo por el cual una mutación en *cad3* producía sensibilidad a cadmio, se midió acumulación neta de este metal en tres disruptantes  $\Delta cad3$  independientes y se comparó con la del control silvestre *CAD3*. Se incubaron células en crecimiento exponencial durante 1 hora en medio YPD suplementado con 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  y se midió el contenido de  $\text{Cd}^{2+}$  interno. Se comprobó que los mutantes *cad3* acumulaban más  $\text{Cd}^{2+}$  ( $0.66 \pm 0.06$  nmol/mg de peso seco,  $n=3$ ) que las células silvestres ( $0.40 \pm 0.03$  nmol/mg,  $n = 3$ ), sugiriendo que la sensibilidad a  $\text{Cd}^{2+}$  de las células *cad3* era el resultado de una mayor acumulación del metal. Para comprobarlo, se midió la velocidad de entrada neta de  $\text{Cd}^{2+}$  en células *cad3* y silvestre. Como se observa en la Figura 52, las células *cad3* mostraron una entrada neta de  $\text{Cd}^{2+}$  mayor que las células silvestres *CAD3*. Estos resultados sugieren que Cad3 regula, de forma directa o indirecta, un transportador que interviene en la homeostasis de  $\text{Cd}^{2+}$ .

## DISCUSION

## 4.1. Identificación de la protein fosfatasa calcineurina.

Se aislaron 11 mutantes sensibles al efecto tóxico de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  a partir de 8.100 colonias mutagenizadas con EMS. Por complementación de uno de ellos (mutante *nls1*) se aisló el gen *CNBI*, que codifica la subunidad reguladora de calcineurina. Calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad catalítica, de la que hay dos isoformas en *S. cerevisiae*, *Cna1* y *Cna2*; y una subunidad reguladora, *Cnb1*. Cyert y Thorner (1992) habían descrito que la subunidad reguladora era esencial para la activación de calcineurina y que su ausencia tenía el mismo efecto (incapacidad de adaptación a la feromona) que la ausencia de las dos subunidades catalíticas. Por tanto, una posible explicación al fenotipo de sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  del mutante *nls1* podría ser una disminución o ausencia de la actividad calcineurina debido a una mutación en el gen *CNBI*. Así, se comprobó que la rotura del gen *CNBI* en una cepa silvestre producía sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , aunque no tan severa como en *nls1*. El doble mutante *cna1cna2*, en el que los dos genes que codifican las subunidades catalíticas de calcineurina están mutados, también resultó sensible a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , confirmando el papel esencial de calcineurina en la tolerancia a estos cationes. El cruce del mutante *nls1* con el disruptante *cnb1::HIS3* dió lugar a un diploide sensible, al igual que sus descendientes haploides. Esto demostró que *NLS1* era el gen *CNBI*. La observación de que la mutación *nls1* producía todavía mayor sensibilidad a  $\text{Na}^+$  que la rotura del gen *CNBI* se podría explicar por la existencia de una actividad basal, en ausencia de la subunidad reguladora, de las subunidades catalíticas de calcineurina, como se ha descrito para las subunidades *Cna* de *Neurospora crassa* (Higuchi *et al.*, 1991). Esta actividad basal estaría obstaculizada por una subunidad *Cnb1* defectuosa en el mutante *nls1*.

Calcineurina ya había sido implicada previamente en la regulación del transporte de iones. Así en células guardas de *Vicia faba* regula la entrada de  $\text{K}^+$  a través de canales rectificadores (de corriente) (Luan *et al.*, 1993). En neuronas la actividad calcineurina es necesaria para la inactivación dependiente de defosforilación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Armstrong, 1989). También en células guardas de vegetales, calcineurina modula la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de canales en la vacuola (Allen *et al.*, 1995). En la levadura *S. cerevisiae* el gen *ENA* tiene un papel esencial en la tolerancia a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ . La rotura de este gen provoca sensibilidad a estos cationes y también a pH alcalino (Haro *et al.*, 1991), fenotipo similar al que nosotros observamos en el mutante *nls1*. *ENA1* codifica una ATPasa de la membrana plasmática cuya función es la expulsión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Una posible explicación a la coincidencia de fenotipos en *enal* y *cnb1* podría ser que ambos mutantes fueran defectuosos en el mismo mecanismo de expulsión de  $\text{Na}^+$ . Mediante mediciones del flujo de salida de  $\text{Li}^+$ , Haro *et al.* (1991) había demostrado que la expulsión de  $\text{Li}^+$  en el mutante *enal* era prácticamente nula. Experimentos

similares realizados con el mutante *cnb1* mostraron que la ausencia de calcineurina reducía el flujo de salida de  $\text{Li}^+$  aproximadamente a la mitad respecto del silvestre (Figura 12). Esta reducción en la salida era el resultado de una disminución en la expresión del gen *ENAI* en un mutante *cnb1*. La transcripción del gen *ENAI* se induce por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y pH alcalino en células de *S. cerevisiae* silvestres. Una estirpe *cnb1* que contiene una fusión *ENAI-LacZ* como gen reportero expresa solamente la mitad de la actividad  $\beta$ -galactosidasa detectada en las células *CNB1* control después de inducir con  $\text{NaCl}$  o pH alcalino. Estos datos coinciden con los obtenidos por cuantificación de las señales autoradiografiadas de *ENAI* de hibridaciones northern (Figura 13). Por otra parte, la inducción del promotor de *ENAI* que tiene lugar al cultivar las células en medio AP no se observó en células *cnb1* (Tabla 8). Por tanto, parece que se requiere calcineurina para una adecuada transcripción de *ENAI*. No se pudo inferir otro efecto adicional de calcineurina sobre la traducción o actividad enzimática porque la expresión de la fusión *ENAI-LacZ* en las mismas condiciones utilizadas para las medidas de salida de  $\text{Li}^+$  correlacionaron con el descenso en el grado de salida de  $\text{Li}^+$ . Nuestros resultados indican que hay cierta inducción del promotor de *ENAI* en ausencia de *Cnb1*, pero su actividad es importante en el mantenimiento del nivel de mRNA de la célula. Es importante señalar que la reducción de la expresión de *ENAI* a la mitad con un promotor truncado (Garcia de Blas *et al.*, 1993) resultó en una sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  significativa. Por tanto, una expresión reducida de *ENAI* en células *cnb1* contribuye claramente a su sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ . En linfocitos, calcineurina modula la expresión génica de linfocinas? por desfosforilación de factores de transcripción específicos (Clipstone *et al.*, 1992).

## 4.2. Regulación de la actividad $\text{Na}^+$ -ATPasa dependiente de *Ena1*.

### 4.2.1. Regulación de la expresión de *ENAI*.

#### 4.2.1.1. Represión por glucosa.

Además de calcineurina se han identificado otros genes implicados en la regulación de *ENAI*. El gen *ENAI* está fuertemente regulado a nivel transcripcional, y su expresión aumenta de forma significativa en respuesta a estrés salino y falta de glucosa (Hirata *et al.*, 1995; Alepuz *et al.*, 1997). La adición de glucosa u otro azúcar fácilmente fermentable a células de levadura que crecen en fuentes de carbono más pobres produce un rápido aumento transitorio de la concentración de AMPc, segundo mensajero en la respuesta a nutriente que da lugar a la adaptación metabólica a las condiciones de crecimiento fermentativo. Altos niveles intracelulares de AMPc correlacionan con condiciones de crecimiento ricos en nutrientes, mientras que bajos niveles de AMPc reflejan limitación de nutrientes y condiciones pobres de crecimiento. La función de AMPc es la modulación de la actividad de

la proteína quinasa A (Pka). La Pka se encuentra en estado inactivo cuando la subunidad catalítica está unida a la subunidad reguladora, codificada por el gen *BCY*. La unión de AMPc a la subunidad reguladora libera la subunidad catalítica de Pka en su forma activa. La actividad de Pka tiene dos efectos contrapuestos: por un lado estimula la expresión de genes relacionados con el crecimiento (por ejemplo genes de transporte o metabolismo de azúcares), por otro, disminuye la expresión de genes que responden a estrés (*CTTI*, *HSP12*, *DDR2*, ...). En cuanto al AMPc, su concentración está controlada por una ruta regulatoria en la que intervienen los productos de los genes RAS. Además, AMPc es hidrolizada por una fosfodiesterasa codificada por el gen *PDE* (Hohman *et al.*, 1997). Hirata *et al* (1995) comprobaron que la disrupción de *bcy*, que da lugar a actividad Pka constitutiva, produce inhibición en la inducción de la expresión de *ENAI*. Asimismo, una reducción de los niveles de AMPc por la sobreexpresión del gen *PDEI* causó un incremento en la expresión de *ENAI* en respuesta a altas concentraciones de NaCl. Se demuestra así la implicación de la ruta AMPc-Pka en la regulación negativa de *ENAI*. Proft *et al.* (1999) identificaron una región en el promotor de *ENAI* (-533 a -544) correspondiente a un elemento de reconocimiento  $URS_{MIG-ENAI}$  al que se unen los represores zinc finger Mig1 y Mig2 y el complejo correpresor Ssn6 y Tup1. Alepuz *et al.* (1997) encontraron que la proteína quinasa Snf1 es esencial para liberar *ENAI* de la represión por glucosa. Cuando la fuente de carbono es deficitaria, Mig1 es desfosforilada por la proteína quinasa Snf1, dando lugar a su exportación del núcleo y liberación de la represión.

#### 4.2.1.1.2. *Regulación de la expresión de ENAI por estrés salino.*

##### 4.2.1.1.2.1. *Regulación osmótica dependiente de HOG.*

La inducción por sal de la expresión de *ENAI* puede ser iónica, dependiente de la ruta calcineurina, u osmótica, dependiente de la ruta de las MAP kinasas HOG. Márquez *et al.* (1996) descubrieron que la inducción de *ENAI* está mediado por la ruta HOG a bajas concentraciones de NaCl (0.3 M) y la ruta calcineurina a concentraciones más elevadas (0.8 M). La regulación de *ENAI* por la ruta HOG, no tiene lugar a través del elemento activador STRE, como ocurre con otros genes regulados por HOG como *CTTI* (que codifica una catalasa) o *HSP12* (proteína heat shock), sino a través de un elemento represor. Se trata de  $URS_{CRE-ENAI}$ , similar al elemento de respuesta a AMPc de mamíferos CRE (Cyclic AMP Response Element). La represión se produce por la unión a esta secuencia de Sko1, represor transcripcional tipo bZip. Esta represión se libera por estrés osmótico, por un mecanismo dependiente de Hog1. Al igual que ocurre con la represión por glucosa, la represión de *ENAI* por HOG requiere la participación del complejo correpresor Ssn6-Tup1 (Proft *et al.*, 1999).

#### 4.2.1.1.2.2. Regulación transcripcional dependiente de calcineurina.

La inducción iónica de la expresión de *ENAI* depende de la ruta calcineurina, y tiene lugar a elevadas concentraciones de sal (0.6-1 M de NaCl). Se ha identificado el factor de transcripción que activa la expresión del gen *ENAI* dependiente de calcineurina. Se trata del producto del gen *TCN1/CRZ1* (Matheos *et al.* y Stathopoulos *et al.*, 1997). La proteína Tcn1/Crz1 es un factor de transcripción de 678 aminoácidos, que contiene tres dedos de zinc tipo C2H2 que media interacciones entre proteína y ácidos nucleicos en el extremo carboxilo, mientras que en extremo amino terminal contiene una región que interacciona con calcineurina (Matheos *et al.*, 1997). El factor de transcripción Tcn1/Crz1 no sólo media la expresión de *ENAI*, sino también la de otros genes regulados por calcineurina: *PMCI* (Ca<sup>2+</sup>-ATPasa vacuolar, Cunningham *et al.*, 1994), *PMRI* (Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de Golgi, Antebi *et al.*, 1992) y *FKS2* (1,3-β-glucano sintasa, Eng *et al.*, 1994). En el promotor de *FKS2* se ha identificado un posible elemento de reconocimiento de Tcn1/Crz1, de 24 pb (Stathopoulos *et al.* 1997). El crecimiento del mutante *tcn1* era similar al del silvestre en medio estándar, pero la tolerancia a Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> era significativamente menor. El factor de transcripción Tcn1/Crz1 es por tanto esencial para la expresión de los genes *ENAI*, *PMRI*, *FKS2* y *PMCI* en respuesta a una señal dependiente de calcineurina.

#### 4.2.1.3. Otros reguladores transcripcionales de *ENAI*.

Otros factores que también afectan la expresión de *ENAI* son los productos de los genes *HAL3/SIS2*, *PPZ1* y *PPZ2*. Ferrando *et al.* (1995) describieron el gen *HAL3/SIS2*, cuya sobreexpresión aumenta la tolerancia a sodio debido a un incremento en la expresión de *ENAI*. La acción de Hal3 sobre *ENAI* es independiente y aditiva a la de calcineurina. Por otro lado, Posas *et al.* (1995) encontraron que la delección de los genes *PPZ1* y *PPZ2*, que codifican Ser/Thr fosfatasa involucradas en integridad celular, aumentó la tolerancia a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> de manera dependiente de *ENAI* e independiente de calcineurina. La ausencia de actividad *PPZ1/PPZ2* resultó en un aumento en los niveles de RNAm de *ENAI*, indicando un papel represor de estas fosfatasa en la expresión de *ENAI*. Más tarde se encontró que existe una relación funcional entre Hal3 y Ppz1 (Nadal *et al.*, 1998). Hal3 interacciona con Ppz1 e inhibe su actividad fosfatasa, dando como resultado un aumento en la expresión de *ENAI*. Hemenway *et al.* (1999) identificaron otro gen, *LIC4* (Lithium Convertas), que codifica una proteína localizada en el núcleo. La mutación *lic4* redujo aún más la expresión de *ENAI* del mutante calcineurina. La regulación transcripcional de *ENAI* depende también de la protein quinasa casein quinasa II, tetrámero formado por dos subunidades catalíticas (α, α'), y dos reguladoras (β, β'), codificadas por los genes *CKA1*, *CKA2*, *CKB1* y *CKB2* respectivamente. La mutación *ckb* reduce la expresión de *ENAI*, que afecta tanto los niveles basales de expresión como a la inducción de la transcripción (Tenney *et al.*, 1999).



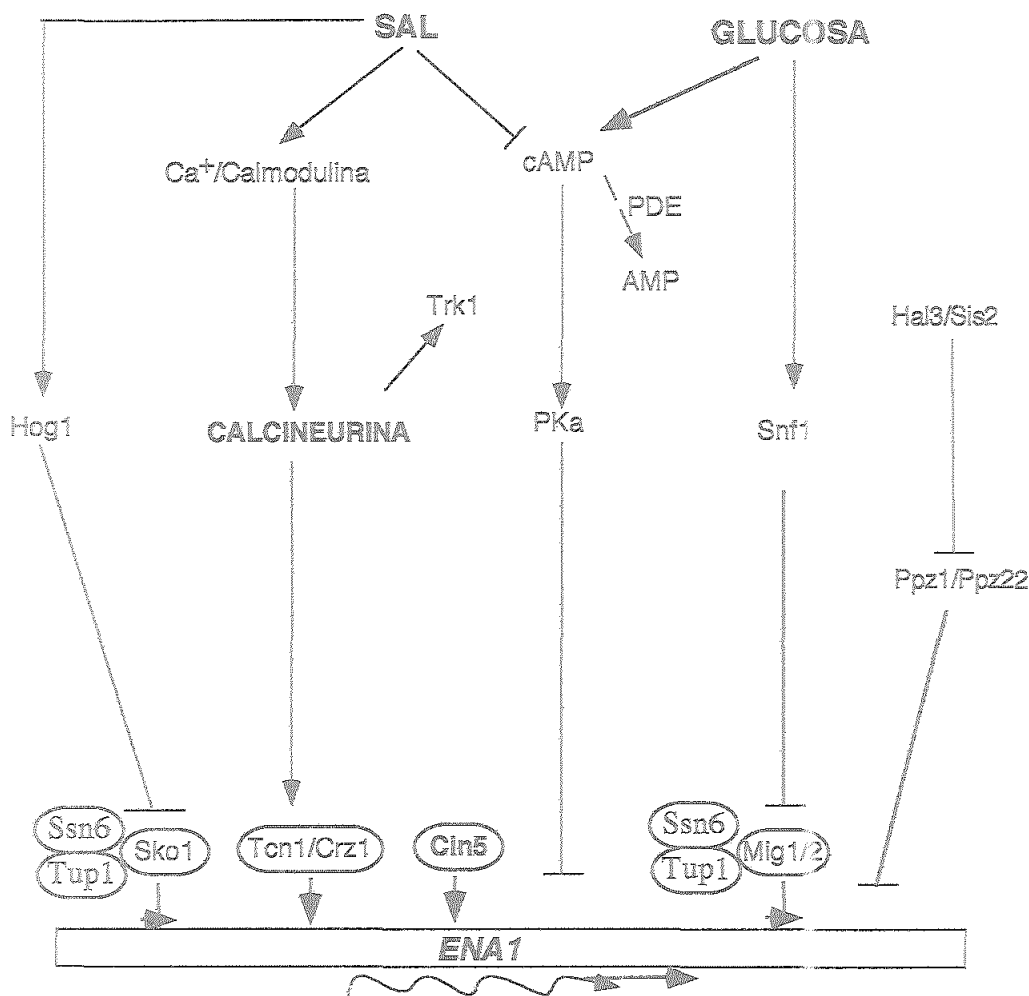
En la Figura 53 se muestra un esquema de algunos de los componentes que intervienen en la regulación de la expresión del gen *ENAI*.

#### 4.2.2. Regulación post-traducciona1 de *Ena1*.

Existen evidencias de una regulación postraducciona1 de *Ena1*, Wieland *et al.* (1995) encontraron que la actividad de la  $\text{Na}^+$ -ATPasa *Ena1* depende de calmodulina también en ausencia de calcineurina. Esta regulación es a nivel postraducciona1, ya que ocurre incluso cuando se expresa *ENAI* bajo un promotor constitutivo. El mecanismo de activación podría ser que la unión de calmodulina desplaza el dominio autoinhibidor en el extremo carboxilo de *Ena1*, dejando accesible el dominio catalítico, tal como está descrito en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática en humanos (James *et al.*, 1988). En nuestro laboratorio se han obtenido resultados que sugieren que calcineurina regula también la actividad de *Ena* a nivel postraducciona1. Cuando se sustituyó el promotor de *ENAI* por un promotor constitutivo (*PGK*) en un mutante *cnb1*, el flujo de salida de  $\text{Li}^+$  seguía estando reducido respecto al silvestre *CNBI*, indicando una menor actividad de la  $\text{Na}^+$ -ATPasa en ausencia de calcineurina. Esto indicaba que calcineurina seguía siendo necesaria para una actividad plena  $\text{Na}^+$ -ATPasa, aunque la expresión del gen fuera constitutiva. Esto podría explicarse por una regulación de la proteína  $\text{Na}^+$ -ATPasa por parte de calcineurina, como ocurre en células neuronales de cerebelo (Marcaida *et al.*, 1991) y células tubulares de riñón (Aperia *et al.*, 1992), en las que se ha encontrado que la actividad de la  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPasa está regulada por desfosforilación directa o indirectamente dependiente de calcineurina.

#### 4.3. Regulación de la toma de $\text{K}^+$ dependiente de *Trk1* y *Trk2*.

La reducción en la expresión de *ENAI* no era suficiente para explicar el gran incremento en sensibilidad a  $\text{Li}^+$  del mutante *cnb1*, comparable al del mutante *ena1*. Experimentos hechos en colaboración con el laboratorio del Dr. Rodríguez-Navarro demostraron la implicación de calcineurina en la entrada de  $\text{K}^+$ . Calcineurina parece ser esencial en la transición del sistema de captación de  $\text{K}^+$  de baja a alta afinidad en respuesta a estrés salino, en el que está involucrada la proteína de membrana codificada por el gen *TRK1*. En condiciones normales, la entrada de  $\text{K}^+$  en la célula tiene lugar mediante transporte de baja afinidad. En condiciones de bajo  $\text{K}^+$  en el medio o en presencia de otros cationes que compiten con  $\text{K}^+$  por los transportadores de entrada en la célula, el transporte dependiente de *Trk1* pasa a ser de alta afinidad para  $\text{K}^+$  con lo que se garantiza el aporte de este ión esencial en la célula. Así cuando el medio de cultivo contiene  $\text{Na}^+$  el sistema de transporte aumenta la afinidad por  $\text{K}^+$  pero la  $K_m$  de  $\text{Na}^+$  permanece inalterada, dando como resultado una mayor discriminación desde niveles milimolares a micromolares de  $\text{K}^+$  respecto de  $\text{Na}^+$ . En experimentos en que se midió entrada de  $\text{Rb}^+$  (utilizado como análogo del  $\text{K}^+$ ) se comprobó



**Figura 53. Regulación de la expresión de *ENA1*.** La regulación por sal depende de las rutas HOG y calcineurina. En la represión catabólica del gen intervienen dos protein kinasas, Snf1 y Pka, regulada a su vez por AMPc. Los factores de transcripción Tcn1/Crz1 y Cin5 inducen la expresión de *ENA1*, mientras que los represores Sko1 y Mig1,2, junto con los correpresores Ssn6 y Tup1 inhiben la expresión. Las flechas indican activación. Las rectas, represión. El rectángulo representa al gen *ENA1*. Los factores de transcripción o represores se representan por óvalos.

que en condiciones salinas que dan lugar a una proporción de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  intracelular próximo a 1, las células *CNBI* presentaban una  $K_m$  para  $\text{Rb}^+$  de 80  $\mu\text{M}$ , mientras que en las células *cnb1* era de 1.6 mM. Es decir, la ausencia de calcineurina impedía el aumento en la afinidad por  $\text{K}^+$  de hasta 20 veces, dando como resultado una mayor entrada de  $\text{Na}^+$  en las células *cnb1* comparadas con las células control *CNBI*. Nuestros resultados indican que la desfosforilación de proteína mediada por calcineurina está relacionada, directa o indirectamente, en la regulación de Trk1 en respuesta a estrés por  $\text{Na}^+$ . Dado que la transición al estado de alta afinidad no requiere síntesis de proteínas (Ramos *et al.*, 1986), es probable que el control de calcineurina sobre Trk1 sea postraducciona, directa o indirectamente. Otro aspecto interesante de la regulación de Trk1 por calcineurina es que tiene lugar exclusivamente en respuesta a estrés salino. En células silvestres la transición del transporte de  $\text{K}^+$  al estado de alta afinidad puede ocurrir debido a estrés por  $\text{Na}^+$  o escasez de  $\text{K}^+$  en el medio. Las células *cnb1*, deficientes en calcineurina, no fueron capaces de realizar la transición al estado de transporte de alta afinidad por  $\text{K}^+$  en condiciones de estrés por  $\text{Na}^+$ , pero sí en bajo  $\text{K}^+$ . Esto indica la existencia de dos rutas de señales convergentes que regulan la transición del estado de transporte de  $\text{K}^+$  de baja a alta afinidad, siendo calcineurina esencial en la ruta de señales específica al estrés por  $\text{Na}^+$ .

#### 4.4. Señalización por $\text{Ca}^{2+}$ del estrés sódico.

La inducción de *ENAI* dependiente de calcineurina, que responde específicamente a la toxicidad iónica y no a estrés osmótico, y la transición de Trk1 al estado de alta afinidad en respuesta a altos niveles de  $\text{Na}^+$  y no a escasez de  $\text{K}^+$  sugiere que la ruta calcineurina se activa de manera específica por iones  $\text{Na}^+$ . Como el único mecanismo conocido de regulación de calcineurina es activación por calcio, el modelo más plausible es que concentraciones elevadas de  $\text{Na}^+$  provocan un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular de la levadura, de la misma manera que el estrés salino aumenta la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en protoplastos de raíz de maíz (Lynch *et al.*, 1989). No se conoce aún cómo se inicia la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando las células de levadura perciben el estrés iónico, pero parece que tiene lugar una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular porque mutantes deficientes en *Cch1* (supuesto canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática) y *Mid1* (subunidad necesaria para el funcionamiento del canal) se encuentran afectados en procesos dependientes de calcineurina, entre ellos la expresión de *ENAI* y tolerancia a iones (Paidhungat *et al.*, 1997). Otra posibilidad es que altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  podrían elevar el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la membrana vacuolar. El intercambiador vacuolar de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , *Vcx1*, podría mediar esta actividad si el ión  $\text{Na}^+$  reemplazara a  $\text{H}^+$  (Serrano *et al.*, 1999). Este incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico daría lugar a la activación de calcineurina al unirse este catión a la subunidad reguladora *Cnb1* y a calmodulina.

Además de la regulación de los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  intracelular, otra función de calcineurina es la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . Calcineurina regula los transportadores primarios *Pmc1* y *Pmr1* (Cunningham *et al.*, 1994), y el antiportador *Vcx1* (Garrett-Engele *et al.* y Tanida *et al.*, 1995). *Pmc1* y *Pmr1* son  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas localizadas respectivamente en la membrana vacuolar y Golgi, cuya función es la compartimentación de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. El nivel de expresión de estas proteínas se induce por calcineurina. Por otro lado, la actividad calcineurina reprime al antiportador *Vcx1* (intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ), bloqueando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la vacuola. En células con versiones mutadas de *Vcx1*, insensibles a calcineurina, se produce una intensa e irregular compartimentación de  $\text{Ca}^{2+}$ , en condiciones ambientales en las que calcineurina estaría normalmente activada. En estos mutantes, se interrumpe la inducción de *ENAI* dependiente de calcineurina (Cunningham y Fink, 1996). Estos resultados sugieren que la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es una respuesta fisiológica al estrés por  $\text{Na}^+$ , necesario para la inducción dependiente de calcineurina de factores de tolerancia específicos, y que la inactivación transitoria de *Vcx1* por calcineurina facilita la producción eficiente de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cunningham y Fink, 1996). Sin embargo, aunque la inactivación de calcineurina libera la represión de la compartimentación vacuolar de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de *Vcx1*, una mutación secundaria en *Pmc1*, que revierte la excesiva compartimentación de  $\text{Ca}^{2+}$ , sólo restaura parcialmente la tolerancia a  $\text{Na}^+$  (Danielsson *et al.*, 1996). Por otro lado, el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de intercambio rápido (es decir, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico) del mutante calcineurina y otros mutantes sensibles a la toxicidad de  $\text{Na}^+$  son similares, o incluso alcanzan niveles más elevados que en células silvestres (Danielsson *et al.*, 1996, Matsumoto, Pardo y Hasegawa, resultados sin publicar). Estos resultados indican que ni la compartimentación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  explica la sensibilidad de  $\text{Na}^+$  de los mutantes calcineurina, ni los elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico per se bastan para desencadenar la respuesta a estrés por  $\text{Na}^+$ .

En otros procesos celulares en los cuales se genera una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , la especificidad de la señal de salida parece estar determinada por una regulación sutil de las fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y una integración de varias señales de entrada. Matheos *et al.* (1997) habían demostrado que el tratamiento por  $\text{NaCl}$  desencadena la activación dependiente de calcineurina (y por tanto dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de *ENAI/PMR1*, pero no de *PMCI* y *FKS2*, que también son activados por calcineurina y *Tcn1* en respuesta a elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  externo y feromona, respectivamente. La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  interfirió con la inducción de *ENAI* por  $\text{Na}^+$ , y de forma recíproca,  $\text{Na}^+$  bloqueó la inducción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de *PMCI*. Estos resultados indican que aunque varios procesos celulares están gobernados por  $\text{Ca}^{2+}$ , calcineurina y *Tcn1*, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generado por estrés salino se interpreta con alta especificidad e inhibe otras rutas dependientes de calcineurina. Esta respuesta diferenciada implica discriminación entre variaciones en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.5. Sobreactivación de calcineurina.

Habiendo demostrado que calcineurina es esencial en la adaptación a sal de células de *S. cerevisiae* por su papel regulador de la actividad de la Na<sup>+</sup>-ATPasa y el sistema de transporte de K<sup>+</sup>, nuestro siguiente objetivo fue manipular calcineurina para obtener células más resistentes a estrés por Na<sup>+</sup>. Calcineurina actúa como mediadora entre la señal producida por un incremento de Na<sup>+</sup> intracelular, que probablemente provoca un aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup>, y una respuesta coordinada de los transportadores de iones necesarios para contrarrestar el exceso de Na<sup>+</sup>. Una sobreactivación de calcineurina debería producir una respuesta incluso en ausencia de señal, dando lugar a células más preparadas para soportar condiciones de estrés salino. Experimentos en células T Jurkat habían demostrado que la transfección con una subunidad Cna carente del dominio de unión a calmodulina y del dominio autoinhibidor, no requería la señal de Ca<sup>2+</sup> para activar la transcripción del gen de la interleukina-2. Esto es, la truncación de la subunidad catalítica resultó en una actividad calcineurina constitutiva *in vivo* (Parsons *et al.*, 1994). Con estos precedentes decidimos manipular la subunidad Cna2 al ser su contribución a la tolerancia a Na<sup>+</sup> mayor que la de Cna1 (ver Sección 3.2). Esto se podría explicar por una diferencia funcional entre los isozimas que forman Cna1 y Cna2. La disparidad en la secuencia de aminoácidos (64% identidad) es lo suficientemente significativa como para justificar una diferencia funcional (Nakamura *et al.*, 1993). Otra posible explicación podría ser una mayor abundancia de Cna2 respecto de Cna1. Cuando sobreexpresamos la proteína Cna2 truncada después del aminoácido treonina en la posición 459, eliminando el sitio de unión a calmodulina y el péptido autoinhibidor, no se obtuvo el efecto esperado de mayor tolerancia a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>, a menos que fuera acompañada de la sobreexpresión simultánea de la subunidad reguladora B. Esto coincide con resultados que apuntan a la necesidad de la subunidad B para la total activación de calcineurina. Así, se ha visto que Cna2tr1 es incapaz de complementar al mutante *cnb1*. Además, un plásmido que contiene una subunidad truncada Cna2 en la que se ha eliminado también el dominio de unión a Cnb1 (truncación en Metionina 409) no suprime el fenotipo de sensibilidad a Na<sup>+</sup> del doble mutante *cnb1cna2*, al producir una subunidad catalítica incapaz de unirse a la subunidad reguladora. Estos resultados demostraron que la unión de la subunidad reguladora es esencial para la actividad de la subunidad catalítica *in vivo*. Los diferentes resultados obtenidos de mamíferos y levadura podrían deberse a la disponibilidad de las subunidades catalíticas endógenas para la unión y activación de la subunidad catalítica expresada de forma ectópica. La subunidad Cnb podría ser limitante en células de levadura, mientras que existen evidencias de que la subunidad B endógena se encuentra en exceso respecto de la subunidad A en células Jurkat (Milan *et al.*, 1994). La contribución de la subunidad reguladora a la actividad del enzima es importante, como ya demostraron estudios previos. Merat *et al.* (1985) analizaron la contribución a la actividad de las subunidades aisladas por desnaturalización del holoenzima

purificado, resolviendo las subunidades por varios métodos de fraccionamiento, y renaturalizando las subunidades *in vitro*, individualmente y en combinación. La actividad de la subunidad A de calcineurina de mamíferos fue tan sólo de un 10% de la del holoenzima (A:B), incluso en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina. Otro estudio consistió en expresar una isoforma de Cna de rata expresada en células de insectos y se observó que la actividad específica de esa subunidad A recombinante era muy baja, pero podía estimularse 10-15 veces por la adición de subunidad B purificada de cerebro bovino, y otras 10-15 veces por adición de subunidad B y calmodulina (Perrino *et al.*, 1992). De forma similar, una subunidad Cna de *N. crassa*, expresada y purificada de *E. coli*, mostró una actividad específica de menos de 10% de la del holoenzima, tanto en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina (Higuchi *et al.*, 1991). La función de la subunidad Cnb1 en parece ser la de producir un cambio conformacional en Cna tras la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , de manera que aumenta la afinidad del enzima por su sustrato (Perrino *et al.*, 1994). Por otro lado, la subunidad Cnb1 sufre una modificación postraducciona denominada miristoilación, que consiste en la eliminación del residuo Met en el extremo amino y la unión de ácido miristoilico al grupo amino del residuo Gly en la posición 2. Esta modificación podría ser esencial para una adecuada localización de la proteína en una membrana celular, una mayor estabilidad, o algún efecto sobre la forma que permita una unión más eficiente a las subunidades catalíticas (Cyert *et al.*, 1992).

Cuando se transformaron células silvestres de varias estirpes con un plásmido multicopia que contenía el gen truncado *CNA2tr1* y el gen *CNBI*, se observó un claro aumento en la tolerancia a NaCl y LiCl. Sin embargo, la coexpresión de la proteína Cna2 completa, junto con la subunidad reguladora Cnb1 tuvo un efecto muy pequeño sobre la tolerancia, sugiriendo la existencia de otros factores que limitan la actividad de la calcineurina silvestre. Uno de esos factores podría ser calmodulina, que no se necesitaría para la actividad del complejo Cna2tr1/Cnb1, aunque esta explicación es poco probable ya que calcineurina es una de las proteínas con mayor afinidad por calmodulina (Klee *et al.*, 1988) y ésta se encuentra posiblemente en exceso respecto a calcineurina en células de levadura.

#### 4.5.1. Efecto de la sobreactivación de calcineurina sobre el transporte de iones.

Como era de esperar, la sobreactivación de calcineurina produjo sobre *Ena1* y *Trk1* el efecto contrario al provocado por la ausencia de actividad calcineurina. El nivel de expresión del gen *ENAI* en una cepa con una calcineurina sobreactivada era 3 veces superior al del control en ausencia de estrés y hasta 8 veces más en presencia de NaCl. Este aumento de expresión se traducía en un incremento en el flujo de salida de  $\text{Li}^+$  en las células con calcineurina constitutiva. Estos datos apoyan un papel clave de calcineurina en la respuesta

celular al estrés por  $\text{Na}^+$ . Cunningham y Fink (1994) habían demostrado que niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los mutantes *pmc1* y *pmr1*, carentes de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, inhiben el crecimiento de las levaduras y distorsionan la forma celular por la permanente activación de calcineurina. Nosotros observamos que la sobreexpresión de *Cnatr1/Cnb1* en células silvestres también provoca una morfología anormal y un retraso del crecimiento. Una posible explicación a que se puedan conseguir consecuencias similares por un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico o por sobreexpresión de calcineurina sugiere que la truncación de la subunidad catalítica podría reducir el umbral para la activación de calcineurina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta conclusión es consistente con la demostración de que la delección de la región reguladora de la subunidad catalítica reduce la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  de calcineurina (Perrino *et al.*, 1995). Posiblemente, esta menor dependencia se debe a que la subunidad B de una calcineurina proteolíticamente truncada (análoga al complejo recombinante *Cna2tr1/Cnb1*) tiene mayor afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  que el enzima nativo, permitiendo activación a unos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (0.3  $\mu\text{M}$ ) por debajo de los que se han encontrado en células estimuladas (0.5-1  $\mu\text{M}$ ) (Stemmer *et al.*, 1994, Perrino *et al.*, 1995). Además se ha propuesto que calcineurina reprime la retención de  $\text{Ca}^{2+}$  en un compartimento intracelular (Tanida *et al.*, 1995, Cunningham *et al.*, 1996), presumiblemente para amplificar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por tanto, la expresión de una calcineurina truncada con un requerimiento reducido por  $\text{Ca}^{2+}$  para la actividad podría aumentar aún más la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, exacerbando la activación de calcineurina y otras proteínas dependientes de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, es poco probable que un incremento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico pueda por sí mismo ser suficiente para desencadenar específicamente la respuesta a estrés por  $\text{Na}^+$  en ausencia del inductor (es decir,  $\text{Na}^+$ ). Nuestros datos apoyan un papel clave de calcineurina en la respuesta a estrés por  $\text{Na}^+$ . Por un lado, la activación constitutiva de calcineurina no sólo acentúa la expresión de *ENAI* tras inducción por  $\text{NaCl}$ , sino que también permite la expresión de *ENAI* en ausencia del inductor. En segundo lugar, la actividad calcineurina no sólo es esencial para la transición del sistema de toma de  $\text{K}^+$  al estado de alta afinidad bajo estrés por  $\text{Na}^+$ , sino que la activación de calcineurina fue capaz, por sí misma, sin inducción por  $\text{Na}^+$ , de cambiar el sistema de transporte de  $\text{K}^+$  a un estado de una mayor discriminación de  $\text{K}^+$  sobre  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Tal respuesta coordinada y específica al estrés por  $\text{Na}^+$  de dos diferentes transportadores de iones probablemente requiere la integración de señales diferentes para la activación de rutas específicas. Puesto que la activación de calcineurina por sí sola puede sustituir tal integración, calcineurina es probablemente un componente clave de la ruta que regula la homeostasis de iones en levadura. En otras palabras, la activación de calcineurina es una señal necesaria y suficiente para la respuesta celular al estrés por  $\text{Na}^+$ .

#### 4.5.2. Efecto de la sobreactivación de calcineurina sobre la morfología de la célula.

Otra consecuencia de la sobreactivación de calcineurina en *S. cerevisiae* fue un cambio en la morfología celular. Cuando expresaban la calcineurina recombinante Cnatr1/Cnb1, algunas células cambiaban de forma, pasando de redondeadas a alargadas. A este cambio en la morfología se unía además un cambio en el patrón de gemación. En células haploides con patrón de gemación axial, las células forman nuevas yemas en un lugar adyacente al de gemaciones previas. En células diploides, la gemación es polar. La primera yema aparece en el polo opuesto al de nacimiento de la célula madre, y las yemas subsiguientes aparecen en cualquiera de los dos polos. En las pseudohifas, el patrón es unipolar y la gemación se produce siempre en el polo opuesto al de nacimiento (Gimeno *et al.*, 1992). Cuando se sobreexpresó calcineurina la gemación pasaba de axial a polar en células haploides. A menudo, las células alargadas permanecían pegadas después de la gemación polar, dando lugar a cadenas de células alargadas que se asemejaban a pseudohifas. Un fenómeno similar se había observado por la sobreexpresión o activación constitutiva de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) o de la proteína Pam1, que suprime el defecto en el crecimiento de células deficientes en PP2A. En ambos casos se producían cadenas de células alargadas muy parecidas a las obtenidas por la expresión de Cnatr1/Cnb1. PP2A modula la morfogénesis durante la diferenciación en pseudohifa en respuesta a falta de nitrógeno en *S. cerevisiae* (Blacketer *et al.*, 1993). Sin embargo, no encontramos sinergismo entre la activación de calcineurina y la falta de nitrógeno que diera lugar a una transición total al crecimiento en pseudohifa. Tampoco se observó entre PP2A ó Pam1 y calcineurina sobreactivada. Además el momento de la división celular y la duración de las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> no coincidieron con los observados en las pseudohifas. Una posible explicación es que el conjunto de características fenotípicas distintivas de pseudohifas estén controladas de forma independiente. Por ejemplo, los mutantes haploides *elm* mostraron separación celular retardada y la capacidad de invadir el agar; sin embargo, no presentaban el patrón de gemación unipolar sino la típica gemación axial de células haploides silvestres (Blacketer *et al.*, 1993). Por otro lado, la sobreexpresión de Phd1, un regulador transcripcional del dimorfismo celular, inducía el crecimiento en pseudohifa de diploides pero no en haploides, a pesar de que promovía la aparición de células alargadas en haploides (Gimeno *et al.*, 1994).

Un patrón de gemación definido requiere información espacial y el establecimiento de polaridad celular. Nuestros datos indican que calcineurina podría afectar la polaridad y la regulación del lugar de gemación. Por una lado, la activación constitutiva de calcineurina induce un cambio en el patrón de gemación de axial a polar en células haploides. En segundo lugar, la inactivación de calcineurina por disrupción del gen *CNBI* causó gemación aleatoria en células haploides de la estirpe DBY746. Sin embargo, ya que no todas las células que



expresan la calcineurina recombinante Cna2tr1/Cnb1 son alargadas, y que la deficiencia de calcineurina no alteraba el patrón de gemación en todos los fondos genéticos examinados, la interacción de calcineurina con polaridad celular y patrón de gemación parece indirecta.

Cuando se producen mutaciones en proteínas que determinan la selección del lugar de gemación o el establecimiento de polaridad, el resultado es una gemación aleatoria (Chant *et al.*, 1991). Entre las proteínas necesarias para la polaridad celular se encuentra Cdc24, que interacciona, entre otras, con Bem1, proteína ensambladora localizada en el lugar de gemación. Esta interacción es inhibida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Zheng, 1995). Además, ciertas mutaciones *cdc24* causan gemación aleatoria y sensibilidad a elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chant *et al.*, 1991). Por otro lado, calmodulina se concentra en el lugar de formación de la yema, antes de su emisión, lo que sugiere que proteínas reguladas por calmodulina podrían participar en el crecimiento celular polarizado (Brockert *et al.*, 1992). Todo esto apunta a una implicación de calcineurina en los mecanismos de gemación y establecimiento de la polaridad. Queda por determinar si calcineurina participa de forma específica en la morfología celular y la gemación, o si los cambios observados se deben a perturbaciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  por alteraciones en la actividad de calcineurina.

#### 4.6. Factor de transcripción Yap4.

La complementación de otro mutante sensible a NaCl (*nls2*), permitió identificar al gen *YAP4*, cuya sobreexpresión aumenta la tolerancia a NaCl y LiCl del mutante *nls2*. Análisis genéticos demostraron que *YAP1* no es *NLS2*, sino un supresor del fenotipo de sensibilidad. Por otra parte, la mutación *yap4* en una cepa silvestre no aumentó la sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ . *YAP4* codifica un factor de transcripción de la familia bZip, de la que se han identificado otras 7 proteínas similares en *S. cerevisiae*. Entre ellas, al menos dos, Yap1 y Yap2 están relacionadas con la respuesta a estrés (Gounalaki *et al.*, Hirata *et al.*, 1994). La proteína más parecida a Yap4 es Ydr259/Cad3. Ambas son 86% idénticas en la región básica y 44% en el dominio de dimerización.

Además de *nls2*, *YAP4* suprime también la mutación *cnb1*. Medidas de tolerancia a NaCl demostraron que la supresión del fenotipo de sensibilidad del mutante *cnb1* por sobreexpresión de *YAP4* requería la presencia de los genes *ENAI-4*, lo que sugería que el papel de Yap4 en tolerancia debía ser la transactivación de alguno de estos genes. En experimentos de acumulación de  $\text{Li}^+$  se comprobó que la sobreexpresión de Yap4 en los mutantes *cnb1* y *nls2* redujo la acumulación de iones  $\text{Li}^+$ . Este efecto no tenía lugar en cepas carentes de *ENAI-4*. Garcíadeblas *et al.* (1993) habían descrito que sólo el gen *ENAI* tiene un promotor inducible, mientras que los otros genes del tándem son constitutivos y con un bajo nivel de expresión. Coincidiendo con esto, la supresión del fenotipo de sensibilidad a

Na<sup>+</sup> del mutante *cnb1* por sobreexpresión de *YAP4* sólo tuvo lugar en presencia de *ENAI* y era independiente de los otros genes tándem. Por tanto la supresión de la sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> de los mutantes *cnb1* y *nls2* por sobreexpresión de *Yap4* se podría explicar por un incremento en la transcripción de *ENAI*. Mediciones de la expresión del gen reportero en una cepa que contiene la fusión *ENAI::LacZ* demostró que la sobreexpresión de *YAP4* aumenta los niveles de expresión de *ENAI*, tanto en presencia como ausencia de calcineurina. Hay un ligero incremento en el nivel de expresión de *ENAI* incluso en ausencia de inducción por NaCl, lo que sugiere que *Yap4* podría actuar como potenciador de los niveles basales de transcripción. Además de *ENAI*, calcineurina regula también la actividad del transportador *Trk1*, aunque esta regulación parece tener lugar a nivel postranscripcional. En ausencia de *Trk1* también se produce complementación del mutante *cnb1*, lo que indica que la supresión del fenotipo de sensibilidad a sal por sobreexpresión de *Yap4* no cursa a través de *Trk1*. La regulación de la expresión del gen *ENAI* depende fundamentalmente de dos rutas de señales: calcineurina y HOG (Márquez *et al.*, 1996), siendo la concentración de sal en el medio la que determina el predominio de una u otra. Análisis de epistasia indicaron que *Yap4* actúa de forma independiente a HOG. Así el doble mutante  $\Delta hog1 \Delta yap4$  parece más sensible a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> que el mutante simple  $\Delta hog1$ , sugiriendo que *Yap4* depende de la ruta calcineurina y no de la ruta HOG en la regulación de la expresión de *ENAI*.

Para ver si una posible función de *Yap4* es la transcripción de genes en respuesta a señales mediadas por calcineurina, se realizaron los experimentos de tolerancia a metales y medidas de expresión con el gen *PMRI*, que codifica una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de Golgi, regulada también por calcineurina. Los mutantes *pmr1* y *cnb1* son sensibles a Mn<sup>2+</sup>. La transformación de estos mutantes con un plásmido multicopia que contiene *YAP4* dió lugar a tolerancia en el caso de *cnb1* pero no tuvo ningún efecto en *pmr1*, indicando que al igual que ocurría con *ENAI* la posible función de *Yap4* podría ser la regulación de la expresión de *PMRI*. Mediciones de actividad del gen reportero *LacZ* mostraron nuevamente que la sobreexpresión de *Yap4* aumenta ligeramente los niveles basales de expresión de *PMRI*, pero no su inducción en presencia de Mn<sup>2+</sup>. El que *Yap4* aumente la tolerancia a Na<sup>+</sup> y Mn<sup>2+</sup> de manera dependiente de *ENAI* y *PMRI* sugiere que *Yap4* es un factor de transcripción que activa la expresión de genes en respuesta a una señal que cursa a través de calcineurina. Sin embargo, la disrupción del gen *YAP4* no produjo fenotipo de sensibilidad a Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ó Mn<sup>2+</sup>, por lo que debe haber otros factores de transcripción con una función redundante a la de *Yap4*.

Además de *YAP4*, se han identificado otros factores de transcripción cuya sobreexpresión incrementa la actividad transcripcional del gen *ENAI*. Se trata de los productos de los genes *TCN1/CRZ1/HAL8* (Matheos *et al.*, 1997, Stathopoulos *et al.*, 1997 y Mendizábal *et al.*, 1998), *HAL9* (Méndizabal *et al.*, 1998) y *CAD3/HAL7* (Mendizábal *et al.*, 1998 y este

trabajo). Los dos primeros corresponden a factores de transcripción tipo zinc finger. Su inactivación produce sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  y reduce el nivel de inducción por  $\text{NaCl}$  de la expresión de *ENAI*. Como ya se indicó anteriormente, *Tcn1* parece ser el factor de transcripción que regula la expresión no sólo de *ENAI*, sino de otros genes regulados por calcineurina (*PMCI*, *PMRI* y *FKS2*). La disrupción *tcn1* producía un fenotipo de sensibilidad no sólo a  $\text{Na}^+$ , sino también a  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y factor  $\alpha$ , aunque menos acusado que el que se observa en un mutante *cnb1* (Matheos *et al.*, Stathopoulos *et al.*, 1997 y Figuras 44, 45). La sobreexpresión de *Yap4* en el mutante *tcn1* suprimió el fenotipo de sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$  indicando que *Yap4* actúa de forma independiente a *Tcn1* al menos en la expresión de los genes *ENAI* y *PMRI*.

#### 4.7. Factor de transcripción *Cad3*.

Mediante comparaciones con secuencias en el banco de datos se identificó el gen *CAD3*, que codifica una proteína que tiene una gran homología con *Yap4*. La existencia de una proteína similar y con una función redundante podría ser la explicación de la ausencia de fenotipo de sensibilidad a  $\text{Na}^+$  en el mutante *yap4*. Sin embargo, ambas mutaciones combinadas (*cad3 yap4*) tampoco produjeron sensibilidad a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  o  $\text{Mn}^{2+}$ . Se comprobó el comportamiento del doble mutante *cad3 yap4* y los mutantes simples *yap4* y *cad3*, en distintas condiciones de crecimiento para encontrar una en la que alguno de estos genes fuera esencial. Se había descrito que otras proteínas de la familia *Yap* son necesarias en la tolerancia a ciertas drogas, metales o agentes oxidantes (Stephen *et al.*, 1995). Así por ejemplo, niveles elevados de *Yap1* o *Yap2/Cad1* producen resistencia pleiotrópica a drogas como cicloheximida y una mayor tolerancia a metales tóxicos como cadmio o zinc. Pero mientras que la mutación *cad1* no tiene ningún efecto sobre la tolerancia, el mutante *yap1* es hipersensible a  $\text{Cd}^{2+}$  (Wu *et al.*, 1993). Cuando se incubó en presencia de metales ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ ), agua oxigenada o cicloheximida, el crecimiento del mutante *yap4* fue similar al del silvestre. Sin embargo, el mutante *cad3* resultó ser muy sensible a  $\text{Cd}^{2+}$ . Esta sensibilidad coincidió con una mayor acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  en el mutante *cad3* en comparación con el silvestre, sugiriendo que *Cad3* podría regular un transportador de este metal. El producto del gen *YCF1*, presumiblemente una proteína de membrana, podría ser uno de los transportadores regulados por *Cad3*. Hay evidencias de que este transportador está regulado por *Yap1*. Mutantes carentes *ycf1* son hipersensibles a  $\text{Cd}^{2+}$  y esta hipersensibilidad es epistática a la sobreexpresión de *Yap1* (Wemmie *et al.*, 1994).

Recientemente, Furuchi *et al.* (2001) encontraron que *YAP4* y *CAD3* confieren resistencia en *S. cerevisiae* a Cisplatino (*cis*-Diaminodicloroplatino), uno de los agentes más utilizados en quimioterapia.

## 5. CONCLUSIONES.

- La proteína fosfatasa calcineurina es esencial en la tolerancia a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y pH alcalino de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Calcineurina regula positivamente la expresión basal y el nivel de inducción por NaCl y pH alcalino del gen *ENAI*, que codifica la  $\text{Na}^+$ -ATPasa de membrana plasmática.
- Calcineurina regula el sistema de transporte de  $\text{K}^+$  dependiente de Trk1, siendo necesaria para la transición del estado de baja a alta afinidad por  $\text{K}^+$  en condiciones de estrés por NaCl.
- La activación constitutiva de calcineurina requiere la coexpresión de las subunidades catalítica y reguladora. La subunidad catalítica debe ser truncada para eliminar los dominios autoinhibidor y de unión de calmodulina.
- La activación constitutiva de calcineurina incrementa la expresión basal y la inducción por NaCl del gen *ENAI*.
- La activación constitutiva de calcineurina produce un incremento en la afinidad por  $\text{K}^+$  del transportador Trk1 desligada del estrés por NaCl.
- La activación constitutiva de calcineurina produce alteraciones en la forma y patrón de gemación de las células de *S. cerevisiae*, promoviendo la formación de pseudohifas.
- La sobreexpresión de Yap4, un factor de transcripción tipo bZip, aumenta la tolerancia a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$  de un mutante deficiente en calcineurina.
- Yap4 aumenta los niveles de expresión de los genes *ENAI* y *PMRI*, pero no es esencial para su transcripción.
- La actividad de Yap4 es independiente de la ruta HOG y del factor de transcripción Tcn1, que media la expresión de *ENAI* y de *PMRI* dependiente de calcineurina.
- El gen *CAD3/YAP6* es esencial en la tolerancia a  $\text{Cd}^{2+}$  de *S. cerevisiae*.
- La mutación *cad3* aumenta la acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  en el interior de la célula.

## 6. BIBLIOGRAFIA.

Allen G.J., Sanders D. (1995.) Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. *The Plant Cell* 7, 1473-1483.

Antebi A. and Fink G. (1992). The yeast  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase homologue, *PMRI*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol. Biol. Cell* 3, 633-654.

Aperia A., Ibarra F., Svensson L.B., Klee C. and Greengard P. (1992). Calcineurin mediates  $\alpha$ -adrenergic stimulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in renal tubule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7394-7397.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology* (ed.). Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.

Armstrong D.L. (1989). Calcium channel regulation by calcineurin, a  $\text{Ca}^{2+}$  activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci.* 12, 117-122.

Becker & Guarante (1991). *Method Enzymol.* 194, 182-187.

Blacketer M.J., Koehler C.M., Coats S.G., Myers A.M. and Madaule P. (1993). Regulation of Dimorphism in *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of the novel Protein Kinase Homolog Elm1p and Protein Phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5567-5581.

Bohnert H.J., Nelson D.E. y Jensen R.G. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111.

Botstein D., Falco S.C., Stewart S.E. Brenan M., Scherer S., Stinchcomb D.T., Struhl K., and Davis R.W. (1979). Sterile host yeasts (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8, 17-24.

Bradford M.M. (1976). A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Breuder T., Hemenway C.S., Movva N.R., Cardenas M.E. and Heitman J. (1994). Calcineurin is essential in cyclosporin A- and FK506-sensitive yeast strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 91, 5372-5376.

Brewster J.L., de Valoir T., Dwyer N.D., Winter E. and Gustin M. (1993). An Osmosensing Signal Transduction Pathway in Yeast. *Science* 259, 1760-1763.

Brockhoff S.E., Davis T.N. (1992). Calmodulin concentrates at regions of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 118, 619-29.

Bullock W.O., Fernández J.M. and Short J.M. (1987). *XLI-blue*: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.

Camacho M., Ramos J. and Rodríguez Navarro A. (1981).  $\text{K}^+$  requirements of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 6, 295-299.

- Cameron A. M., Steiner J. P., Roskams A. J., Ali S. M., Ronnett G.V. and Snyder S.H. (1995). Calcineurin Associated with the Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor-FKBP12 Complex Modulates  $Ca^{2+}$  Flux. *Cell* 83, 463-472.
- Cardenas M.E., Hemenway C., Muir R.S., Ye R., Fiorentino D. and Heitman J. (1994). Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.*, 13, no.24, 5944-5957.
- Clipstone N.A., Crabtree G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697.
- Coghlan V.M., Perrino B.A., Howard M., Langeberg L.K., Hicks J.B., Gallatin W.M. and Scott J.D. (1995). Association of Protein Kinase A and Protein Phosphatase 2B with a Common Anchoring Protein. *Science* 267, 108-111.
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508.
- Chant J, Pringle JR (1991). Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin. Genet. Dev.* 1, 342-350.
- Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H. and Hieter P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110 (1), 119-122.
- Cunningham K.W. and Fink G.R. (1994). Calcineurin-dependent Growth Control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a Homolog of Plasma Membrane  $Ca^{2+}$ -ATPases. *J. Cell Biol.* 124, 351-363.
- Cunningham K.W. and Fink G.R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent  $H^{+}/Ca^{2+}$  exchange and induces  $CA^{2+}$  ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, No. 5, 2226-2237.
- Cyert M.S., Kunisawa R., Kaim D. and Thorner J. (1991). Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7376-7380.
- Cyert M.S., and Thorner J. (1992). Regulatory subunit (*CNBI* gene product) of yeast  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3460-3469.
- Danielsson A., Larsson C., Larsson K., Gustafsson L. and Adler L. (1996). A genetic analysis of the role of calcineurin and calmodulin in  $Ca^{2+}$ -dependent improvement of NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 30, 476-484.
- Dichtl B., Stevens A., Tollervey D. (1997). Lithium toxicity in yeast is due to inhibition of RNA processing enzymes. *EMBO J.* 16, 2565-2575.
- Douglas C.M., Foor F. Marrinan J.A., Morin N., Nielsen J.B., Dahl A.M., Mazur P., Baginsky W., Li W., El-Shergeini M., Clemas J.A., Mandala S.M., Frommer B.R. and Kurtz M.B. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*EGT1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12907-12911.
- Eible R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioFeedback* 13, 18-20.

- Eng W.K., Faucette L., McLaughlin M.M., Cafferkey R., Koltin Y., Morris R.A., Young P.R., Johnson R.K. and Livi G.P. (1994). The yeast *FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene* 151, 61-71.
- Evans, E.G.V., and Richardson, M.D., eds. (1989). *Medical mycology: a practical approach* (Oxford: Information Press Ltd.).
- Farcasanu I.C., Hirata D., Tsuchiya E., Nishiyama F. and Miyakawa T. (1995). Protein Phosphatase 2B of *Saccharomyces cerevisiae* is required for tolerance to manganese, in blocking the entry of ions into the cell. *FEBS. Lett.* 232, 712-717.
- Fairman C., Zhou X., Kung C. (1999). Potassium uptake through the TOK1 K<sup>+</sup> channel in the budding yeast. *J. Membrane Biol.* 168(2): 149-57
- Fernandes L., Rodrigues-Pousada C. and Struhl K. (1997). Yap, a novel family of eighth bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell Biol.* 17, 6982-6993.
- Ferrando A., Kron S.J., Rios G., Fink G.R. and Serrano R. (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol. Cell Biol.* 15, 5470-5481.
- Frantz B., Nordby E., Bren G., Steffan N., Paya C.V., Kincaid R.L., Tocci M.J., O'Keefe S.J. and O'Neill E.A. (1994). Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate Icb/MAD3, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* 13, 861-870.
- Foor F., Parent A., Morin N., Dahl A.M., Ramadan N., Chrebet G., Bostian K.A. and Nielsen J.B. (1992). Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from  $\alpha$ -factor arrest in yeast. *Nature* 360, 682-683.
- Furuchi T., Ishikawa H., Miura N., Ishizuka M., Kajiya K., Kuge S. and Naganuma A. (2001). Two Nuclear Proteins, Cin5 and Ydr259c, Confer Resistance to Cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* 59, 470-474.
- Ganster R.W., McCartney R.R. and Schmidt M.C. (1998). Identification of a calcineurin-independent pathway required for sodium ion stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 31-42.
- Garciadeblas B., Rubio F., Quintero F.J., Bañuelos M.A., Haro R. y Rodríguez-Navarro A. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. (1992). *Mol. Gen. Genet.* 236, 363-368.
- Garrett-Engle P., Moilanen B. and Cyert M.S. (1995). Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4103-4114.
- Gimeno C.J., Ljungdahl P.O., Styles C.A. and Fink G.R. (1992). Unipolar Cell Divisions in the Yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077-1090.
- Gimeno C.J. and Fink G. (1993). Induction of Pseudohyphal Growth by Overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2100-2112.

- Gläser H-U., Thomas D., Gaxiola R., Montrichard F., Surdin-Kerjan Y., and Serrano R. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12, 3105-3110.
- Gounalaki N. and Thireos G. (1994). YAP1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO J.* vol. 13 no.17, 4036-4041.
- Guthrie C. and Fink G.R. (1991). *Methods of Enzymology Volume 194. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology.* Academic Press, INC.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557.
- Healey A.M., Zolnierowicz S., Stapleton A. E., Goebel M., DePaoli-Roach A.A. and Pringle J. R. (1991). CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5767-5780.
- Heitman J., Koller A., Kunz J. Henriquez R., Schmidt A., Movva N.R. and Hall M. (1993). The immunosuppressant FK506 inhibits amino acid import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5010-5019.
- Hemenway C.S., Heitman J. (1999). Lic4, a nuclear phosphoprotein that cooperates with calcineurin to regulate cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* Mar; 261(2), 388-401
- Higuchi S., Tamura J., Giri P.R., Polli J.W., Kincaid R.L. (1991). Calmodulin-dependent protein phosphatase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and expression of recombinant catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 266, 18104-18112.
- Hill J.E., Myers A.M., Koerner T.J. and Tzagoloff A. (1993). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167.
- Hirata D., Yano K. y Miyakawa T. (1994) Stress-induced transcriptional activation mediated by *YAP1* and *YAP2* genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 250-256.
- Hirata D., Harada S., Namba H. and Miyakawa T. (1995). Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet.* 249, 257-64.
- Hoyt M.A., Stearns T. and Botstein D. (1990). Chromosome instability mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that are defective in microtubule-mediated processes. *Mol. Cell. Biol.* 10(1), 223-234.
- Hohmann S., Mager W.H. (1997). *Molecular Biology Intelligence Unit. Yeast Stress Responses.* R.G. Landes Company.
- Hu G. and Ronne H. (1994). Overexpression of yeast *PAMI* Gene permits survival without protein phosphatase 2A and induces a filamentous phenotype. *J. Biol. Chem.* 269, 3419-3435.
- Hubbard M.J., Klee C.B. (1989). Functional Domain Structure of Calcineurin A: Mapping by limited Proteolysis. *Biochemistry* 28, 1868-1874.



- Inagaki N., Ito M., Nakano T. and Inagaki M. (1994). Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends in Biochem. Sci.* 19, 448-452.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A.K., Krebs, J., Penniston, J.T. and Carafoli, E. (1988). Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 263, 2905-2910.
- Jia Z.-P., McCullough N., Martel R., Hemmingsen S., Young P.G. (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter confers sodium and lithium tolerance. *EMBO J.* 11: 1631- 1640.
- Karin M. and Smeal T. (1992). Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem. Sci.* 17, 418-422.
- Kincaid R. (1993). Calmodulin-Dependent Protein Phosphatases from Microorganisms to Man. A Study in Structural Conservatism and Biological Diversity. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 27.
- Klee C.B., Crouch T.H., Krinks M.H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(12), 6270-3.
- Klee C.B., Draetta G.F. and Hubbard M.J. (1988). Calcineurin. *Adv. Enzymol.* 61, 149-200.
- Kuno T., Tanaka H., Mukai H., Chang C., Hiraga K., Miyakawa T. and Tanaka C. (1991). cDna cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 180, 1159-1163.
- Lewis J.G., Learmonth R.P. and Watson K. (1995). Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 141, 687-694.
- Li W. and Handschumacher R.E. (1993). Specific interaction of the cyclophilin-cyclosporin complex with the B subunit of calcineurin. *J. Biol. Chem.* 268, 14040-14044.
- Liu Y., Ishii S., Tokai M., Tsutsumi H., Ohki O., Akada R., Tanaka K., Tsuchiya E., Fukui S., Miyakawa T. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* genes (*CMP1* and *CMP2*) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B. *Mol. Gen. Genet.* 227, 52-59 .
- Liu J., Farmer J.D., Lane W.S., Friedman J., Weissman I. and Schreiber S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Liu J. (1993). FK506 and ciclosporin: molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993 May; 14(5), 182-8.
- Lippuner V., Cyert M.S. and Gasser C.S. (1996). Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *J. Biol. Chem.* 271, 12859-12866.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S.M. and Saito H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245.

- Maeda T., Takekawa M. and Saito H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269, 554-558.
- Mager W.H. and de Kruijff A.J.J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 506-531.
- Marcaida G., Kosenko E., Miñana M.D., Grisolia S. and Felipo V. (1996). Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase that results in its activation in cerebella neurons in culture. *J. Neurochem.*, Vol.66, No. 1, 99-103.
- Márquez J.A. and Serrano R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* 382, 89-92.
- Masson J.Y. and Ramotar D. (1998). The transcriptional activator Imp2p maintains ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149, 893-901.
- Matheos D.P., Kingsbury T.J., Ahsan U.S. and Cunningham K.W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 3445-3458.
- Mazur P., Morin N., Baginsky W., Elsherbeini M., Clemas J.A., Nielsen J.B. and Foor F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-d-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* 15(10), 5671-5681.
- Mendizabal I., Rios G., Mulet J.M., Serrano R. and Larrinoa I.F. (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* 425, 323-328.
- Merat D.L., Hu Z.Y., Carter T.E., and Cheung W.Y. (1985). Bovine brain calmodulin-dependent protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 260, 11053-11059.
- Milan D., Griffith J., Su M., Price E.R. and McKeon F. (1994). The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 79, 437-447.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Moreno F., Cabrera F., Andreu L., Vaz R., Martín-Aranda J., Vachaud G. (1995). *Agri. Water Manage.* 27, 25-44.
- Momayezi M., Lumper C.J., Kerkesen H., Gras U., Platter H., Krinks M.H. and Klee C.B. (1987). Exocytosis induction in *Paramecium tetraurelia* cells by exogenous phosphatase in vivo and in vitro: Possible involvement of calcineurin in exocytotic membrane fusion. *J. Cell Biol.* 105, 181-189.
- Nakamura T., Liu Y., Hirata D., Namba H., Harada S., Hirokawa T. and Miyakawa T. (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* 12 no.11, 4063-4071.
- Nakamura T., Ohmoto T., Hirata D., Tsuchiya E. and Miyakawa T. (1996). Genetic evidence for the functional redundancy of the calcineurin- and Mpk1-mediated pathways in the regulation of cellular events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 251, 211-219.
- Nass R., Cunningham K.W., Rao R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 26145-26152

- Nass R, Rao R. (1998). Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *J. Biol. Chem.* 273: 21054-21060.
- Niu S., Bressan R.A., Hasegawa P.M. and Pardo J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 735-742.
- O'Keefe S.J., Tamura J., Kincaid R.L., Tocci M.J. and O'Neill E.A. (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357, 692-694.
- Paidhungat M. and Garret S. (1997). A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca<sup>2+</sup> uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6339-6347.
- Parent S.A., Nielsen J.B., Morin N., Chrebet G., Ramadan N., Dahl A.M., Hsu M., Bostian K.A. and Foor F. (1993). Calcineurin-dependent growth of an FK506 and CsA-hypersensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2973-2984.
- Parsons J.N., Wiederrechts G.J., Salowe S., Burbaum J.J., Rokosz L.L., Kincaid R.L. and O'Keefe S.J. (1994). Regulation of calcineurin phosphatase activity and interaction with the FK- 506. FK-506 binding protein complex. *J. Biol. Chem.* 269, 19610-19616.
- Perrino B.A., Fong Y.L., Brickley D.A., Saitoh Y., Ushio Y., Yasugawa S., Fukunaga K., Miyamoto E., Sakamoto Y., Uyemura K. and Soderling T.R. (1992). Characterization of the phosphatase activity of a baculovirus-expressed calcineurin A isoform. *J. Biol. Chem.* 267, 15965-15969.
- Perrino B.A., Ng L.Y. and Soderling T.R. (1995). Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 270, 340-346.
- Pluthero F.G. (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* Vol 21, No. 20, 4850-4851.
- Posas F., Casamayor A. and Ariño J. (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett* 318 number 3, 282-286.
- Posas F., Camps M. and Ariño J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13036-13041.
- Posas F., Wurglermurphy S.M., Maeda T., Witten E.A., Thai T.C. and Saito H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 two-component osmosensor. *Cell.* 86(6), 865-875.
- Posas F, Saito H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276 (5319), 1702-1705.
- Posas F., Witten E.A., and Saito H. (1998). Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18(10), 5783-96

- Pozos T.C., Sekler I. and Cyert M.S. (1996). The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is required for vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange and is related to mammalian  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  Exchangers. *Mol. Cell. Biol.* 16-7, 3739-3741.
- Quintero F.J., Blatt M.R. y Pardo J.M. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporters. *FEBS Lett.*, 471, 224-228.
- Pringle J.R., Preston R.A., Adams A.E.M., Stearns T., Drubin D.G., Haarer B.K. and Jones E.W. (1989). Fluorescence microscopy methods for yeast. *Method Cell Biol.* Vol. 31, 356-435.
- Prior C., Potier S., Souciet J.L. and Sychrova H. (1996). Characterization of the *NHA1* gene encoding a  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387, 89-93.
- Quintero F.J., Garcíadeblas B. and Rodríguez Navarro A. (1996). The *SAL1* gene of Arabidopsis, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *The Plant Cell* 8, 529-537.
- Ram A.F.J., Brekelmans S.S.C., Oehlen L.J.W.M. and Klis F.M. (1994). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the  $\beta$ 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 358, 165-170.
- Ramos J. y Rodríguez-Navarro A. (1986) Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* 154, 307-311.
- Rao A., Luo C. and Hogan P.G. (1997). Transcription Factors of the NFAT Family: Regulation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-47.
- Rasmussen C., Garen C., Brining S., Kincaid R.L., Means R.L. and Means A.R. (1994). The calmodulin-dependent protein phosphatase catalytic subunit (calcineurin A) is an essential gene in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13, 2545-2552.
- Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein J.M., Hohmann S., Ammerer G. and Ruis H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.* 19(8), 5474-85.
- Roberts R.L. and Fink G. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Gen. Dev.* 8, 2974-2985.
- Ronne H., Carlberg M., Hu G.Z. and Nehlin J.O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4876-4884.
- Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D., and Fink, G.R. (1987). A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60, 237-243.
- Rubio F., Gassmann W. and Schroeder J.I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270, 1660-1663.
- Rusnak F. and Mertz P. (2000). Calcineurin: form and function. *Phys. Rev.* Vol. 8, No. 4, 1483-1521.

- Schüller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M. and Ruis H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.* 13, 4392-4389.
- Schwaninger M., Blume R., Krüger M., Lux G. Oetjen E. and Knepels W. (1995). Involvement of the Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase calcineurin in gene transcription that is stimulated by cAMP through cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 270-15, 8860-8866.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165: 1-52. Review.
- Serrano R., Márquez J.A. and Ríos G. (1997). Crucial factors in salt stress tolerance in yeast stress responses. in: Hohmann S., Mager W.H., eds. *Yeast Stress Responses*, Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company, 147-169.
- Serrano R. y Gaxiola R. (1994). Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Revi. Plant Sci.* 13(2), 121-138.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122 (1), 19-27.
- Singh A. and Sherman F. (1978). Deletions of the iso-1-cytochrome c and adjacent genes of yeast: discovery of the *OSMI* gene controlling osmotic sensitivity. *Genetics* 89, 653-665.
- Stathopoulos AM, Cyert MS. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Gene Dev.* 11, 3432-3444.
- Stephen D.W.S., Rivers S. and Jamieson D.J. (1995). The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 16, 415-423.
- Stein W.D. (1990). Channels, Carriers and Pumps. An introduction to Membrane Transport. Academic Press, INC. pg 38.
- Stemmer P.M. and Klee C.B. (1994). Dual Calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33, 6859-6866.
- Stewart, A.A., Ingebritsen, T.S., Manalan, A., Klee, C.B. and Cohen, P. (1982). Discovery of a Ca<sup>2+</sup>-and calmodulin-dependent protein phosphatase involved in cellular regulation. *FEBS Lett.* 137, 80-84.
- Stewart A.A., Ingebritsen T.S. and Cohen P. (1983). The protein phosphatase involved in cellular regulation. *Eur. J. Biochem.* 132, 289-295.
- Stratford M. (1994). Another brick in the wall?. Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* 10, 1741-1752.
- Tanida I., Hasegawa A., Iida H., Ohya Y. and Anraku Y. (1995). Cooperation of calcineurin and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, No. 17, 10113-10119.
- Tash J.S., Krinks M., Pate J., Means R.L., Klee C.B. and Means A.R. (1988). Induction, characterization and functional correlation of calmodulin-dependent phosphatase in sperm. *J. Cell Biol.* 106, 1625-1633.

- Tenney K.A. and Glover C.V. (1999). Transcriptional regulation of the *S. cerevisiae* *ENA1* gene by casein kinase II. *Mol. Cell Biochem.*; 191(1-2), 161-167.
- Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M., Scott J.D., McMullen B., Hurwitz M., Krebs E.G. and Wigler M. (1987). Cloning and characterization of *BCY*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 7, 1371-1377.
- Trollmo C., André L., Blomberg A. and Adler L. (1988). Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 321-326.
- Ueki K. and Kinkaid R.L. (1993). Interchangeable associations of calcineurin regulatory subunit isoforms with mammalian and fungal catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* 268, 6554-6559.
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11, 1743-1754.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Broksky, G., Rolfe, M. and Rothstein, R. (1989). *Cell* 58, 409-419.
- Wemmie J.A., Wu A.L., Harshman K.D., Parker C.S. and Moye-Rowley W.S. (1994). Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 Protein is required for normal cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* 269, No.20, 14690-14697.
- Wemmie J.A., Szczypka M.S., Thiele D.J., Moye-Rowley W.S. (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J. Biol. Chem.* 269(51), 32592-7.
- Wellhinda A. A., Beavis A. D. and Trumbly R. J. (1994). Mutations in *LIS1(ERG6)* gene confer increased sodium and lithium uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 107-117.
- Wieland J., Nitsche M., Strayle J., Steiner H. and Rudolph H.K. (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* 14, 3870-3882.
- Wu A., Wemmie J.A., Edgington N.P., Goebel M., Guevaras J.L. and Moye-Rowley W.S. (1993). Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J. Biol. Chem.* 268, 18850-18858.
- Yoshida T., Toda T. and Yanagida M. (1994). A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell Sci.* 107, 1725-1735.
- Zhen L., and Swank R.T. 1993. A simple and high yield method for recovering DNA from agarose gels. *BioTechniques* vol. 14, No.6.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Imelda Mendoza Baisas titulada Regulación de la homeostasis de sodio y potasio por la proteína fosfatasa calcineurina acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente con honores por unanimidad

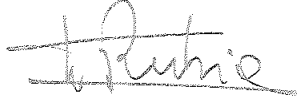
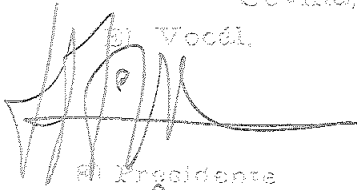
Sevilla, 28 de septiembre

2001

El Vocal,

El Vocal,

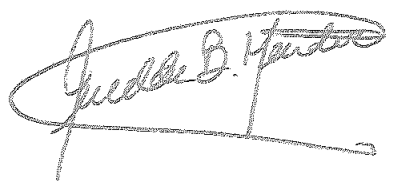
El Vocal,



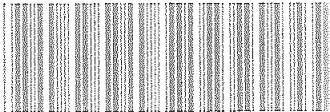
El Presidente

El Secretario

El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672151