

Curso 2011/12  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/4**  
I.S.B.N.: 978-84-15287-93-3

**CELIA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ**

**Represión catabólica por nitrógeno y homeostasis  
catiónica en la levadura *Hansenula polymorpha*.  
Papel de Ure2 y de la calcineurina**

**Director**  
**JOSÉ MANUEL SIVERIO EXPÓSITO**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

El autor ha disfrutado de una beca de Investigación CajaCanarias para Posgraduados (2006-2008) y de una beca del Programa de Formación de Personal Investigador de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (2009-Actual)

## **Agradecimientos**

*Me gustaría agradecer a todos los que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo de tesis doctoral.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. José M. Siverio, que me permitiese formar parte de su grupo de investigación y también, su entrega y buena disposición para que esta tesis prosperase.*

*A mis compañeros de laboratorio. A los más “veteranos” Fran y Braulio por guiar mis primeros pasos en el laboratorio. Gracias también a Yuse y, en especial, a Elisa, Rafa y Yelvis, con las que he compartido gran parte del camino. Sin mis “chicas” la experiencia no hubiese sido la misma. Gracias por vuestra ayuda y por tantos momentos memorables.*

*Al resto de compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por su ayuda y consejos.*

*A continuación, unos agradecimientos telegráficos no menos importantes:*

*- al Dr. Luis Galindo, por su colaboración en la realización de los experimentos de calcio intracelular, por sus ánimos y buenos consejos.*

*- al Dr. Diego Álvarez, y sus becarios Iván y Cristina, por acogerme en su laboratorio unos días y por su disposición para ayudar.*

*En el plano personal quiero agradecer a mi familia su apoyo incondicional en el más amplio sentido de la palabra. Sólo espero que se sientan orgullosos de mí. Y bueno, Tony, gracias por estar a mi lado y por hacerme sentir que soy capaz de afrontar cualquier reto.*

***Celia Rodríguez***

## ÍNDICE SIMPLIFICADO

Abreviaturas y símbolos

INTRODUCCIÓN, 1

OBJETIVOS, 31

RESULTADOS Y DISCUSIÓN, 33

PERSPECTIVAS, 153

CONCLUSIONES, 157

MATERIALES Y MÉTODOS, 159

APÉNDICES, 233

BIBLIOGRAFÍA, 247

## ÍNDICE DETALLADO

### Abreviaturas y símbolos

#### I. INTRODUCCIÓN, 1

1. Medio ambiente y nitrógeno, 1
2. El nitrato y su asimilación por los seres vivos, 3
3. Algunas generalidades sobre *H. polymorpha*, 4
4. La vía de asimilación de nitrato, 4
5. Regulación de la vía de asimilación de nitrato, 6
6. Regulación transcripcional, 7
  - 6.1. Los factores transcripcionales GATA en la regulación de la asimilación del nitrógeno en hongos y levaduras, 8
    - 6.1.1. AreA y Nit2 en *A. nidulans* y *N. crassa*, 9
    - 6.1.2. Gat1, Gln3, Dal80 y Gzf3 en *S. cerevisiae*, 9
  - 6.2. Papel de Ure2 en la regulación de la asimilación del nitrógeno en levaduras, 11
  - 6.3. Cascada de señalización mediada por TOR, 11
- 7.1 Homeostasis catiónica: Papel del potencial electroquímico, 15
- 7.2 Homeostasis catiónica: Papel y regulación de la Na<sup>+</sup>-ATPasa Ena1, 17
- 7.3 La calcineurina en *S. cerevisiae*, 20
8. RCN en *H. polymorpha*, 22
9. Glutatión S-transferasas y detoxificación, 25
  - 9.1. Clasificación de las GST, 26
  - 9.2. GST en hongos y levaduras, 27
  - 9.4. HpUre2 y su similitud con las GST, 29

#### II. OBJETIVOS, 31

#### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, 33

##### CAPÍTULO I

1. Papel de Ure2 en represión catabólica por nitrógeno, 33
  - 1.1 La fosforilación de HpUre2 responde a la calidad de la fuente nitrogenada, 33

1.2 Tor regula el estado de fosforilación de Ure2, 35

## **CAPÍTULO II**

2. Papel de Ure2 en la tolerancia a sales, 37

2.1. Ure2 participa en la regulación del potencial electroquímico, 37

2.2. Ure2 regula la expresión de *ENA1*, 39

2.3. Ure2 participa en la respuesta dependiente de calcineurina, 42

2.4. La delección de *URE2* reduce la expresión génica dependiente de calcineurina y el contenido celular total de  $\text{Ca}^{2+}$ , 52

2.5. La calcineurina regula los niveles de Gat1, 57

2.6. Ure2 regula la expresión de *PMR1* a través de Gat2, 63

2.7. Los niveles de Gat2 están regulados por la calcineurina y por Gat1, 73

2.8. La expresión de *ScURE2* en  $\Delta ure2$  no afecta a los niveles de activación de la calcineurina, 74

SINOPSIS (CAPÍTULOS I-II), 79

Artículo: Ure2 is involved in nitrogen catabolite repression and salt tolerance via  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and calcineurin activation in the yeast *Hansenula polymorpha*, 82

## **CAPÍTULO III**

3. Papel de la calcineurina en la regulación de la asimilación de nitrógeno, 92

3.1. La calcineurina participa en la desrepresión de los genes responsables de la asimilación de nitrato, 92

3.2. La calidad de las fuentes nitrogenadas regula la activación de la calcineurina, 97

3.3. El  $\text{Ca}^{2+}$  podría actuar como segundo mensajero en la transducción de señal de la calidad de la fuente nitrogenada, 99

3.4. La calcineurina participa en la inducción de los genes responsables de la asimilación de nitrato a través de Gat2, 101

3.5 La calcineurina no participa en el tráfico intracelular de Ynt1, 106

3.6. El  $\text{Ca}^{2+}$  induce la completa defosforilación de Ure2, 108

SINOPSIS, 113

Artículo: Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen sources quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels, 115

## **CAPÍTULO IV**

### 4. Estudio de otros mediadores de la señal de nitrógeno, 126

4.1. Caracterización preliminar de Tep1, 126

4.2. Papel de Tep1 en la tolerancia a sales, 130

4.3. Tep1 altera los niveles de fosfoinosítidos, 133

4.4. Papel de la actividad fosfatasa sobre lípidos de Tep1, 137

SINOPSIS, 139

## **CAPÍTULO V**

### 5. Papel de Ure2 en los procesos de detoxificación, 141

5.1. Ure2 participa en la detoxificación de metales pesados, 141

5.2. El cadmio y el CDNB inducen la expresión de *HpURE2*, 142

5.3. Ure2 presenta actividad glutatión S-transferasa frente al ácido etacrínico,  
143

5.4. Ure2 presenta actividad glutatión peroxidasa frente a varios hidroperóxidos,  
147

SINOPSIS, 150

## **IV. PERSPECTIVAS, 153**

## **V. CONCLUSIONES, 157**

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS, 159**

### 6.1. Microorganismos utilizados, 159

6.1.1. Cepas bacterianas, 159

6.1.2. Cepas de levaduras, 159

### 6.2. Esterilización del material, 159

### 6.3. Medios y condiciones de cultivo, 160

6.3.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano, 160

6.3.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de levaduras, 161

- 6.3.3. Medios de cultivo y condiciones para la inducción de los genes de asimilación de nitrato de *H. polymorpha*, 162
- 6.3.4. Siembra por goteo, 163
- 6.4. Transformación de microorganismos, 163
  - 6.4.1. Transformación de bacterias, 163
  - 6.4.2. Transformación de *H. polymorpha*, 164
- 6.5. Técnicas relacionadas con proteínas, 165
  - 6.5.1. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares, 165
  - 6.5.2. Ensayos de actividades nitrato reductasa y  $\beta$ -galactosidasa, 166
    - 6.5.2.1. Obtención de extractos celulares para el ensayo de actividad nitrato reductasa y  $\beta$ -galactosidasa, 166
    - 6.5.2.2. Determinación de actividad nitrato reductasa, 166
    - 6.5.2.3. Determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa, 167
    - 6.5.2.4. Determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa in situ a partir de células permeabilizadas con cloroformo sobre filtros 167
  - 6.5.3. Determinación de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática (Pma1), 168
  - 6.5.4. Obtención de extractos de proteínas solubles para SDS-PAGE, 169
  - 6.5.5. Obtención de extractos de proteínas de membrana para SDS-PAGE, 169
  - 6.5.6. Tratamiento de los extractos proteicos con  $\lambda$ -proteína fosfatasa, 169
  - 6.5.7. Obtención de extractos totales para SDS-PAGE mediante método alcalino, 170
  - 6.5.8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), 170
  - 6.5.9. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF, 171
  - 6.5.10. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas (*western blot*), 172
- 6.6. Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos, 174
  - 6.6.1. Extracción de DNA plasmídico bacteriano a pequeña escala ("mini-preps"), 174
  - 6.6.2. Extracción de DNA total de levadura, 175
  - 6.6.3. Extracción de RNA total de levadura, 176



- 6.6.4. Síntesis de cDNA mediante retrotranscripción, 177
- 6.6.5. Cuantificación del DNA, 177
- 6.6.6. Precipitación de DNA, 178
- 6.6.7. Amplificación de moléculas de DNA por PCR, 179
  - 6.6.7.1. PCR a partir de DNA purificado, 179
  - 6.6.7.2. PCR de colonias de bacterias y levaduras, 181
- 6.6.8. Análisis y modificación de DNA, 182
  - 6.6.8.1. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción, 181
  - 6.6.8.2. Electroforesis de DNA, 182
    - 6.6.8.2.1. Electroforesis en geles de agarosa, 182
  - 6.6.8.3. Construcción de moléculas de DNA recombinantes, 182
    - 6.6.8.3.1. Aislamiento de fragmentos de DNA de geles de electroforesis, 183
    - 6.6.8.3.2. Relleno de extremos 3' no protuberantes, 183
    - 6.6.8.3.3. Desfosforilación de los extremos 5' de moléculas de DNA, 184
    - 6.6.8.3.4. Adición de desoxiadenosinas a extremos 3' romos de moléculas de DNA, 185
    - 6.6.8.3.5. Ligamiento de moléculas de DNA, 186
    - 6.6.8.3.6. Rastreo de los transformantes, 186
  - 6.6.8.4. Secuenciación de DNA, 186
  - 6.6.8.5. Cuantificación relativa de la expresión génica mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), 187
    - 6.6.8.5.1. Proceso experimental, 187
    - 6.6.8.5.2. Determinación de la especificidad. Curvas de fusión, 189
    - 6.6.8.5.3. Método de análisis para la cuantificación relativa de la expresión génica, 190

## 6.7. Metodología específica desarrollada en este trabajo, 192

6.7.1. Expresión del gen *URE2* de *H. polymorpha* en *E. coli*. Purificación de la proteína, 192

6.7.1.1. Sistema de expresión, 192

6.7.1.2. Construcción del plásmido pRSET-URE2, 194

6.7.1.3 Expresión de la proteína, 196

6.7.1.4 Purificación de la proteína bajo condiciones nativas, 196

6.7.2 Determinación de la actividad glutatión peroxidasa, 197

6.7.3 Determinación de la actividad glutatión S-transferasa, 198

6.7.4 Medida del contenido de calcio intracelular mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama, 198

6.7.4.1. Instrumentos para la espectrofotometría de absorción atómica, 199

6.7.4.2. Incremento de la sensibilidad, 201

6.7.4.3 Método de análisis, 202

6.7.4.4 Obtención de extractos totales para la determinación de calcio intracelular mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica, 203

## MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y DISOLUCIONES, 204

6.7.5 Plásmidos construidos en este trabajo, 211

6.7.5.1 Sistema de etiquetado de proteínas, 211

6.7.5.1.1. Etiquetado de Ure2 con el epítipo HA, 211

6.7.5.1.2. Etiquetado de Gat1 con el epítipo HA, 212

6.7.5.1.3 Etiquetado de Gat2 con el epítipo HA, 214

6.7.5.1.4 Etiquetado de Yna1 con el epítipo HA, 216

6.7.5.1.5 Etiquetado de Yna2 con el epítipo HA, 218

6.7.5.2 Elaboración de las cepas de levadura utilizadas en este trabajo, 218

6.7.5.2.1 Construcción de la cepa  $\Delta cnb1::URA3 leu2$ , 220

6.7.5.2.2 Construcción de la cepa  $\Delta crz1::URA3 LEU2$ , 221

- 6.7.5.2.3 Construcción de la cepa  $\Delta pmc1::LEU2 URA3$ , 223
- 6.7.5.2.3 Construcción de la cepa  $\Delta ure2::leu2::URA3 PMR1-lacZ(LEU2) \Delta gat2::ble$ , 225
- 6.7.5.3 Construcción de plásmidos con fusiones a *lacZ*, 226
  - 6.7.5.3.1 Construcción del plásmido pENA1-*lacZ*, 226
  - 6.7.5.3.2 Construcción del plásmido pPMR1-*lacZ*, 227
  - 6.7.5.3.3 Construcción del plásmido pYNR1-EX-ScURE2, 228
  - 6.7.5.3.4 Construcción de la cepa nPMR1, 230
- 6.7.5.4 Otros plásmidos utilizados en este trabajo, 232

Apéndices, 233

Apéndice I: Cepas de *H. polymorpha* utilizadas en este trabajo, 233

Apéndice II: Cebadores utilizados en este trabajo, 236

Apéndice III: Plásmidos utilizados en este trabajo, 241

Apéndice IV: Descripción del genotipo de las cepas bacterianas utilizadas, 245

**VII. BIBLIOGRAFÍA, 247**

## Abreviaturas, símbolos y acrónimos

ATP	Adenosintrifosfato
∅	diámetro
BSA	albúmina de suero bovino
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CDRE	Elemento de respuesta dependiente de calcineurina (Calcineurin-Dependent Response Element)
CCE	Capacitative Ca <sup>2+</sup> Entry
<i>d.n.</i>	durante la noche
dNTP	desoxinucleótido
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiamino tetraacetato sódico
EGTA	etilenglicol tetraacetato sódico
FAD	dinucleótido de flavina y adenina
g	gravedad (valor de aceleración máxima)
HA	hemaglutinina
GMN	Grupo del Metabolismo del Nitrógeno
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación
GST	glutación S-transferasa
IPTG	isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido
kDa	kilodalton
kpb	kilopar de bases
LB	Luria Bertani
MES	ácido 2-[n-morfolino]etanosulfónico
min	minuto
MOPS	ácido 3-[morfolino] propanosulfónico
ms	milisegundos
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato

NiR	nitrito reductasa
nm	nanómetro
NR	nitrato reductasa
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
ORF	pauta abierta de lectura ( <i>open reading frame</i> )
p/v	relación peso-volumen
Pb	pares de bases
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PI(3)P	fosfatidilinositol 3-fosfato
PI(3,4)P <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 3,4-bifosfato
PI(3,5)P <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 3,5-bifosfato
PI(4,5)P <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI(4)P	fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP <sub>3</sub>	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PVDF	difluoruro de polivinilideno
qRT-PCR	retrotranscripción de RNA seguida de PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RCN	represión catabólica por nitrógeno
RNasa	ribonucleasa
RT-PCR	retrotranscripción de RNA seguida de PCR
rpm	revoluciones por minuto
RSAT	Regulatory Sequence Analysis Tools
SDS	dodecil sulfato sodico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamida
T <sub>m</sub>	temperatura media de fusión
TMA	Trimetilamonio
TOR	Target of rapamicin
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidad
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen-volumen

WT	cepa silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
YGNH	medio sintético con cloruro amónico como fuente de nitrógeno
YGNO	medio sintético con nitrato sódico como fuente de nitrógeno
YGAS	medio sintético con sulfato amónico como fuente de nitrógeno
YPD	medio no selectivo para el crecimiento de levaduras

## RESUMEN

Mi trabajo dirigido a alcanzar el grado de doctor se ha centrado fundamentalmente en la caracterización de HpUre2, modulador negativo de la represión catabólica por nitrógeno, en la levadura *Hansenula polymorpha*. Los resultados ponen de manifiesto el papel fundamental de HpUre2 en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y establecen una estrecha relación entre la vía de señalización de la calcineurina y la vía de asimilación de nitrógeno. HpUre2 regula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través del factor transcripcional HpGat2, que induce la expresión del gen de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa *PMR1*. El contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE-Golgi, modula la entrada extracelular del catión actuando sobre sus niveles citosólicos y en consecuencia sobre la activación de la calcineurina. La calcineurina, a través de la regulación de los niveles del factor transcripcional HpGat1, participa en la desrepresión de los genes de la asimilación de nitrógeno. Asimismo, la calidad de las fuentes nitrogenadas regula el estado de activación de la calcineurina. Las fuentes de nitrógeno no preferidas incrementan el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  activando la calcineurina a diferencia de las preferidas. Por tanto, el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como segundo mensajero en la asimilación de nitrato actuando en la señal de desrepresión. Por otra parte, la caracterización enzimática de HpUre2 reveló que presenta actividad GST frente al ácido etacrínico y GPx frente al peróxido de hidrógeno, así como frente a varios hidroperóxidos orgánicos y que participa en la detoxificación de cadmio y cobalto.

# *Introducción*

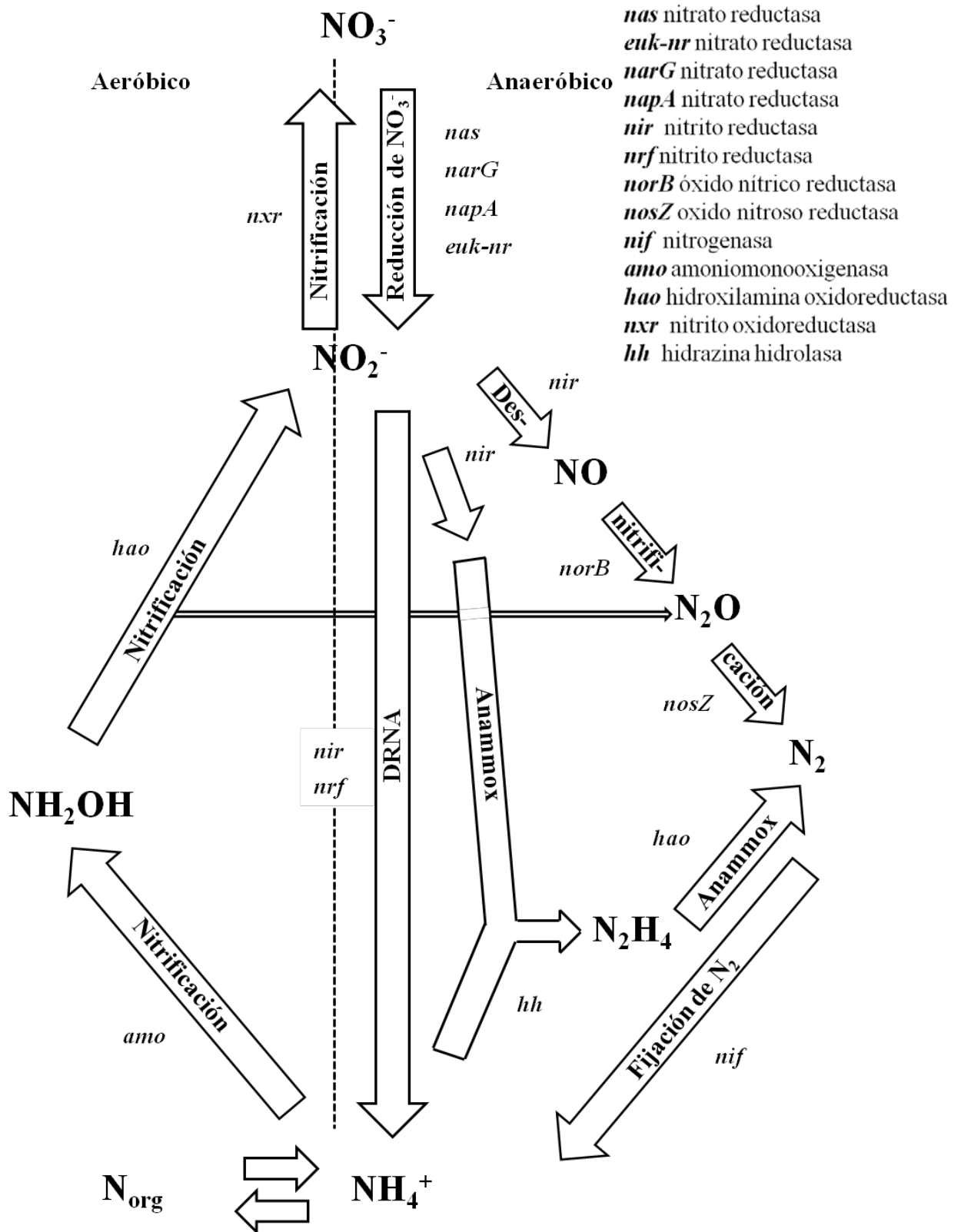
---



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Medio ambiente y nitrógeno

El nitrógeno, quinto elemento más abundante en nuestro sistema solar, es esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, los dos polímeros más importantes de los seres vivos. El requerimiento de nitrógeno de los seres vivos es de 2 a 20 átomos de nitrógeno por cada 100 átomos de carbono dependiendo del organismo. La biogeoquímica del nitrógeno depende casi exclusivamente de reacciones de óxido-reducción mediadas por microorganismos y en menor medida mediante el reciclaje a largo plazo a través de procesos geoquímicos. Los procesos a través de los cuales los seres vivos incorporan el nitrógeno a estas biomoléculas son: la fijación del nitrógeno atmosférico, proceso en el cual el  $N_2$  es reducido a amonio ( $NH_4^+$ ), y la asimilación de nitrógeno directamente como  $NH_4^+$  (o nitrógeno orgánico), procedente del medio o bien de la reducción de formas de nitrógeno oxidadas como el nitrato ( $NO_3^-$ ) y en menor medida, el nitrito ( $NO_2^-$ ). El amonio retorna al medio cuando los organismos mueren siendo secuencialmente oxidado a  $NO_3^-$  mediante una vía dependiente de oxígeno conocida como nitrificación. Por otra parte, el  $NO_3^-$  puede ser usado por algunos microorganismos como un aceptor de electrones durante la respiración anaerobia. La reducción de nitrato se acopla a la oxidación anaeróbica del carbono orgánico produciendo  $NH_4^+$  mediante un proceso conocido como reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA: Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium) o, más comúnmente,  $N_2$  gaseoso durante la desnitrificación. Finalmente, el ciclo del nitrógeno (figura 1) se completa con una ruta alternativa de fijación de nitrógeno llamada anammox (anaerobic ammonium oxidation), donde la oxidación de  $NH_4^+$ , se acopla a la reducción del  $NO_2^-$  (Canfield *et al.*, 2010).



**Figura 1. Principales vías biológicas de transformación del nitrógeno.** Los genes que codifican enzimas que catalizan transformaciones importantes incluyen genes para varias nitrato reductasas (*nas*, *euk-nr*, *narG*, *napA*) nitrito reductasas (*nir*, *nrf*), óxido nítrico reductasa (*norB*), óxido nitroso reductasa (*nosZ*), nitrogenasa (*nif*), amonio monooxigenasa (*amo*), hidroxilamina oxidoreductasa (*hao*), nitrito oxidoreductasa (*nxr*) e hidrozina hidrolasa (*hh*) (Adaptado de Canfield, 2010).

## 2. El nitrato y su asimilación por los seres vivos

El nitrato constituye la principal fuente de nitrógeno asimilable para la mayoría de algas y plantas vasculares superiores. Debido a su importancia en la calidad y cantidad de la productividad agrícola, se ha llevado a cabo un uso intensivo del nitrato como agente fertilizante. Como casi siempre que se intenta intervenir en el equilibrio natural aparecen efectos colaterales sobre los ecosistemas. La acumulación de nitratos en el subsuelo que por lixiviación pueden incorporarse a las aguas subterráneas, o bien ser arrastrados hacia los cauces y reservorios artificiales, representa uno de los problemas ambientales más importante relativo al ciclo del nitrógeno. La contaminación de los acuíferos subterráneos con nitratos genera graves problemas de salud si se consume agua en estas condiciones, debido a la reducción del nitrato a nitrito por la participación de ciertas bacterias presentes en el estómago y vejiga urinaria. A su vez, los nitritos se transforman en compuestos cancerígenos (nitrosaminas), que afectan a estómago e hígado (Powlson *et al.*, 2008).

Es por ello que el estudio de la asimilación del nitrógeno por los seres vivos y en especial del nitrato cobra vital importancia para intentar contrarrestar los efectos adversos mencionados sobre el medio ambiente. Plantas, hongos filamentosos, algunas bacterias y ciertas clases de levaduras forman parte de los ecosistemas que utilizan nitrato como fuente de nitrógeno.

La asimilación de nitrato en levaduras ha recibido una escasa atención en comparación a los intensos estudios llevados a cabo en los hongos filamentosos *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* (Wong *et al.*, 2008). Esto se debe principalmente al hecho de que las levaduras modelo *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* no asimilan nitrato y a la falta de herramientas adecuadas para el estudio genético y molecular de aquellas levaduras que sí son capaces de asimilar nitrato como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, el hecho de que la levadura *Hansenula polymorpha* sea capaz de asimilar nitrato y nitrito como única fuente de nitrógeno (Siverio, 2002) así como la disponibilidad de herramientas para su análisis genético y molecular ha modificado en parte esta situación. Nuestro grupo utiliza las levaduras, en concreto *H. polymorpha*, como modelo para estudiar la asimilación de nitrato: son organismos unicelulares sencillos, de fácil manipulación

genética y rápido crecimiento. Además presentan una vía de asimilación de nitrato muy similar a la de plantas y hongos filamentosos (Siverio, 2002).

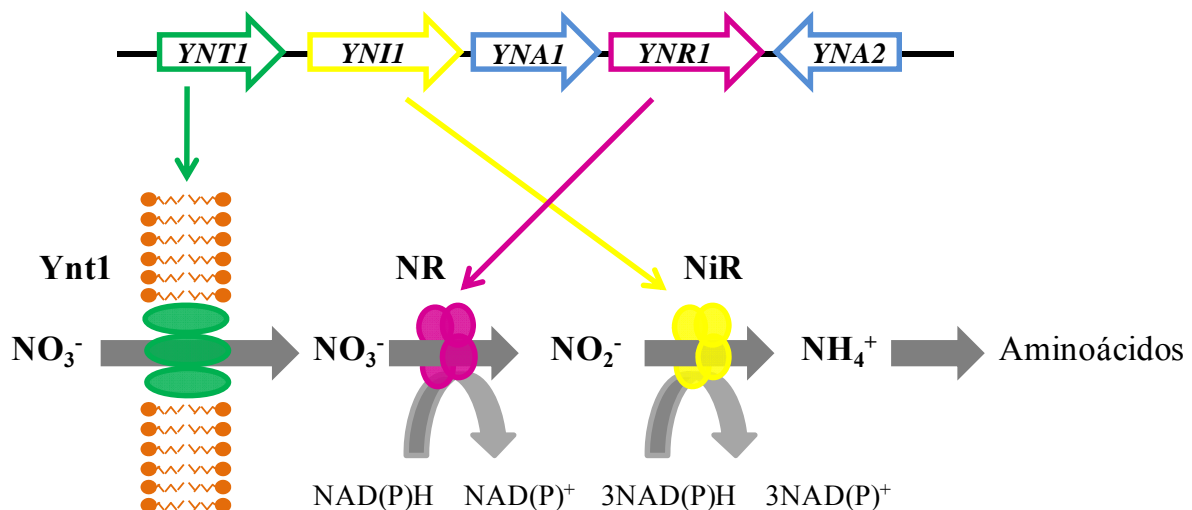
### **3. Algunas generalidades sobre *H. polymorpha***

La levadura *H. polymorpha*, CBS 4732, se aisló por primera vez en 1959 en Brasil (Morais y Maia, 1959). Se trata de una levadura metilotrófica, capaz de crecer a expensas del metanol como única fuente de carbono y energía (Levine y Cooney, 1973). Presenta una alta termotolerancia, siendo posible su crecimiento a temperaturas superiores a 49°C y una fácil interconversión entre los estados haploide y diploide (Teunisson *et al.*, 1960). Otras características que la hacen atractiva para su uso como modelo en investigación son su alta velocidad de crecimiento y la disponibilidad de herramientas para su manipulación genética. Ha sido el modelo de estudio por excelencia en la investigación sobre la función y homeostasis de los peroxisomas (Van der Klei, *et al.*, 1995). Además se ha utilizado con éxito para la producción de proteínas recombinantes a escala industrial, como la vacuna de la hepatitis B o la fitasa utilizada como aditivo alimentario en piensos. Durante la última década se han desarrollado las herramientas moleculares adecuadas para su manipulación y estudio genético y molecular (Siverio, 2002), y además, se ha llevado a cabo la secuenciación de su genoma (Ramezani-Rad *et al.*, 2003). Por tanto, esta levadura es un modelo experimental excelente para el estudio de la asimilación del nitrato.

### **4. La vía de asimilación de nitrato**

Como habíamos mencionado anteriormente, la vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha* sigue un patrón común a plantas y hongos filamentosos: el anión nitrato es conducido al interior celular a través del transportador/es de nitrato. Una vez en el interior es reducido a amonio por las acción consecutiva de las enzimas nitrato y nitrito reductasas (NR y NiR) (figura 2). El amonio generado es finalmente incorporado a los esqueletos carbonados mediante la síntesis de glutamato y glutamina por las vías de la glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa- glutamato sintetasa (Magasanik y Kaiser, 2002).

Los genes estructurales implicados en la asimilación de nitrato en *H. polymorpha* se han aislado y caracterizado (figura 2): *YNRI* codifica la nitrato reductasa, *YNI* la nitrito reductasa e *YNT1* un transportador de nitrato de alta afinidad (Ávila *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997). Ynt1 constituye el principal transportador de nitrato y también transporta nitrito con alta afinidad (Machín *et al.*, 2004). Junto con los anteriores se han descrito también dos factores transcripcionales de tipo Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> *YNA1* (Ávila *et al.*, 1998) e *YNA2* (Ávila *et al.*, 2002) que presentan gran similitud con los reguladores NIT4 y NirA de los hongos filamentosos *A. nidulans* y *N. crassa* respectivamente, activadores también involucrados en la inducción de los genes que producen la maquinaria enzimática implicada en la asimilación de nitrato (Siverio, 2002). Todos estos genes se encuentran agrupados en el genoma de la levadura y son transcritos de forma independiente (figura 2).



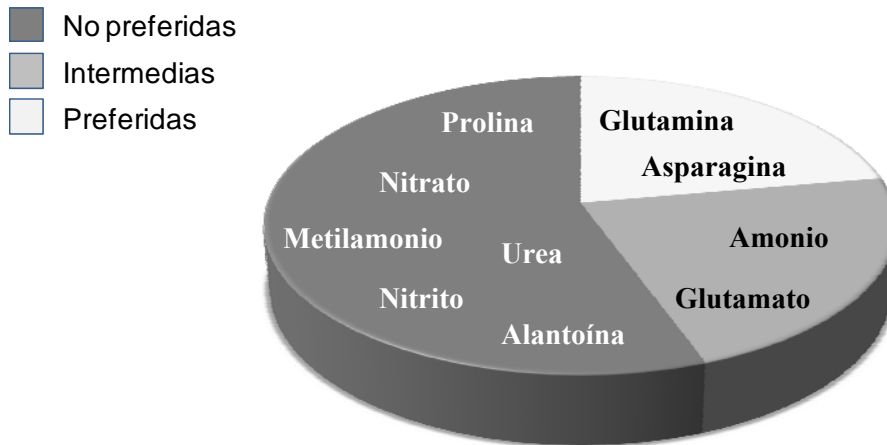
**Figura 2. Organización en *cluster* de los genes relacionados con la asimilación de nitrato en *H. polymorpha* (arriba). *YNT1*, transportador de nitrato-nitrito de alta afinidad; *YNI*, nitrito reductasa; *YNA1* e *YNA2*, factores transcripcionales involucrados en la inducción del resto de los genes del *cluster*; *YNRI*, nitrato reductasa. **Esquema general de la vía de asimilación de nitrato (abajo).** El primer paso consiste en el transporte del nitrato al interior de la célula donde es reducido a nitrito con gasto de 2 electrones. El nitrito es a su vez reducido a ion amonio por transferencia de 6 electrones, y éste se incorpora finalmente a esqueletos carbonos para la síntesis de aminoácidos.**

## 5. Regulación de la vía de asimilación de nitrato

En la mayoría de los organismos asimiladores de nitrato la utilización de éste se encuentra condicionada por la presencia de compuestos de nitrógeno reducido en el medio. Cuando se dispone de nitrógeno reducido todas las vías involucradas en la asimilación de fuentes alternativas, incluida la vía de asimilación de nitrato, sufren un proceso de regulación negativa. En base al efecto que tienen sobre el metabolismo del nitrógeno se puede distinguir entre fuentes de nitrógeno favoritas o preferidas, que desencadenan la regulación negativa del catabolismo de otros compuestos de nitrógeno, y fuentes pobres de nitrógeno, alternativas o no preferidas, que no tienen efecto sobre otros compuestos de nitrógeno (Magasanik y Kaiser, 2002). La llamada represión catabólica por nitrógeno (NCR- Nitrogen Catabolic Repression) es la responsable de que la célula no sintetice permeasas y enzimas exclusivas para la asimilación y metabolismo de fuentes de nitrógeno no preferidas, evitando el gasto innecesario de energía por parte de la célula (Magasanik, 2002; Marzluf, 1997; Magasanik, 1992; Magasanik, 2005; Godard *et al.*, 2007). En base a este tipo de regulación transcripcional podemos realizar una clasificación de las distintas fuentes nitrogenadas según sea la preferencia que tengan las células por ellas. Así, una fuente preferida de nitrógeno será aquella en cuya presencia no se produzca la desrepresión de los genes responsables de la asimilación de otras fuentes alternativas, mientras que las fuentes nitrogenadas capaces de promover la activación de estas vías alternativas se denominarán fuentes no preferidas.

A la hora de clasificar las posibles fuentes nitrogenadas en orden de preferencia por los microorganismos existen casos muy claros. Por ejemplo, la glutamina es una de las fuentes nitrogenadas preferida por excelencia, se trata de un producto final de la confluencia entre las vías metabólicas del carbono y del nitrógeno y a partir de ella la célula puede sintetizar biomoléculas tan importantes como aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc. (figura 3). Además, la velocidad de crecimiento de la mayoría de los microorganismos asimiladores en un medio conteniendo glutamina como única fuente de nitrógeno es superior a la detectada en medios con otras fuentes de nitrógeno menos reducidas. Otra fuente preferida es el amonio que puede incorporarse a los esqueletos carbonados, procedentes de ciclo de Krebs, reaccionando con el  $\alpha$ -cetoglutarato dando lugar a glutamato por acción de la glutamato deshidrogenasa, o reaccionando con el glutamato para generar glutamina por acción de la glutamina sintetasa. De esta forma, el

nitrógeno del grupo amino del glutamato representa el 85% del nitrógeno celular total y el del grupo amido de la glutamina, el 15% restante (Cooper, 1982). En el grupo de fuentes pobres se encuentran prolina, urea, alantoína y nitrato (figura 3).



**Figura 3. Ejemplos de tipos de fuentes nitrogenadas utilizadas por microorganismos clasificadas según su efecto sobre la RCN.**

## 6. Regulación transcripcional

La capacidad de un organismo para integrar las señales celulares y extracelulares del medio donde vive es una propiedad fundamental para su supervivencia y adaptación ambiental. Estas señales celulares se presentan, en una amplia mayoría de los casos en forma de metabolitos intermediarios de diversas rutas metabólicas (Sellick y Reece, 2005). En este sentido la transcripción de los genes de la ruta de asimilación de nitrato responde a dos señales esenciales, la primera, la ausencia de fuentes preferidas de nitrógeno (señal de desrepresión) y la segunda la presencia de nitrato (señal de inducción). La primera de las señales es de carácter general, ya que no sólo desreprime la expresión de los genes necesarios para la asimilación de nitrato, sino también de otras fuentes alternativas de nitrógeno aumentando las posibilidades de asimilar los nutrientes presentes en el medio. La segunda señal es específica, ya que sólo los genes responsables de la asimilación de nitrato responden a la inducción generada por la presencia de nitrato en el medio (Cooper, 2002; Marzluf, 1997; Siverio, 2002). La señal de desrepresión está mediada por el mecanismo de RCN, que es responsable de impedir la transcripción de genes relacionados con la utilización de fuentes de nitrógeno

alternativas cuando se dispone de fuentes de nitrógeno preferidas. En hongos y levaduras el proceso de RCN está mediado por factores transcripcionales del tipo GATA y proteínas que interaccionan con éstos y modulan su actividad (Crawford y Arst, 1993; Magasanik, 2002; Marzluf, 1997; Siverio, 2002; Wong, 2008).

Los factores del tipo GATA son proteínas reguladoras que comparten uno o dos dominios de unión al DNA tipo “zinc finger” (Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys) que reconocen secuencias 5'-GATAA-3' de regiones 5' no codificantes de ciertos genes y que se encuentran presentes en organismos que van desde levaduras hasta humanos (Blinder *et al.*, 1995; Coffman *et al.*, 1997). Su función es la de reprimir o desreprimir la expresión de ciertos genes en respuesta a estímulos generalmente externos, formando parte en la mayoría de los casos de un cascada de transducción de señales (Magasanik, 2005). Están involucrados en procesos tan diversos como la biosíntesis de sideróforos en microorganismos (Rutherford y Bird, 2004), el control de la asimilación de nitrógeno en plantas y microorganismos (Siverio, 2002; Reyes *et al.*, 2004), la regulación de procesos afectados por la luz en seres fotosintéticos (Reyes *et al.*, 2004), la diferenciación de eritrocitos y el desarrollo de linfocitos T en mamíferos (Liew *et al.*, 2005), etc.

### **6.1. Los factores transcripcionales GATA en la regulación de la asimilación del nitrógeno en hongos y levaduras**

Los factores GATA juegan un papel esencial en la regulación de la asimilación de nitrógeno tanto en levaduras como en hongos filamentosos, pero los mecanismos de regulación que controlan su actividad son muy diferentes. Ambos sistemas aseguran la apropiada expresión de un amplio conjunto de genes que permiten a estos organismos responder y adaptarse a la disponibilidad de nitrógeno de su entorno.



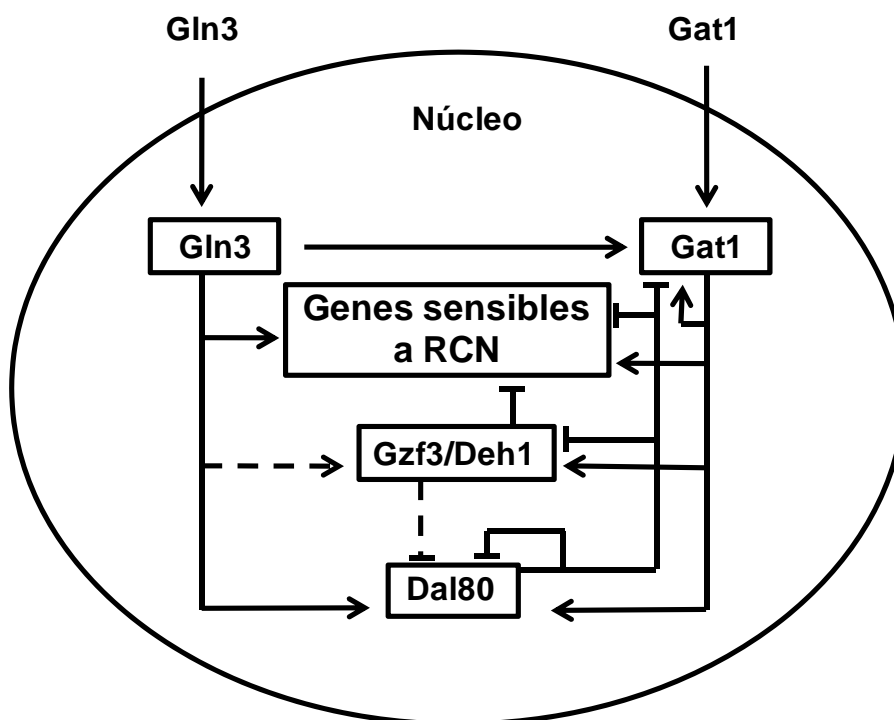
### 6.1.1. AreA y Nit2 en *A. nidulans* y *N. crassa*

En los hongos filamentosos *A. nidulans* y *N. crassa* la regulación del catabolismo del nitrógeno está mediada por los factores GATA, AreA y Nit2, respectivamente. Se trata de reguladores positivos que median la señal de desrepresión activando la expresión de los genes del catabolismo del nitrógeno en ausencia de fuentes de nitrógeno preferidas (Kudla *et al.*, 1990; Minehart y Magasanik, 1991; Caddick, 1994; Marzluf, 1997; Todd *et al.*, 2005). Esta señal de desrepresión es contrarrestada en el momento en el que una fuente preferente de nitrógeno vuelve a estar presente en el medio. Los agentes encargados de antagonizar a AreA y Nit2 son NmrA en *A. nidulans* y Nmr1 en *N. crassa* (Dunn-Coleman *et al.*, 1981; Xiao *et al.*, 1995; Andrianopoulos *et al.*, 1998). Se ha descrito que estos moduladores negativos actúan ocupando los sitios de unión a promotores de AreA y Nit2 (Andrianopoulos *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1997). En el caso de AreA existen al menos otros dos mecanismos que modulan su actividad. En primer lugar, la transcripción de este factor está también sometida a RCN existiendo sitios GATA en su promotor que permiten su regulación autógena (Langdon *et al.*, 1995). En segundo lugar, la estabilidad de los transcritos de AreA es modulada por los niveles intracelulares de glutamina a través de una región de 218 pb conocida como 3' UTR (3'untranslated region). Este mecanismo implica una rápida degradación de los transcritos de AreA en presencia de cantidad suficiente de glutamina (Morozov *et al.*, 2000; Morozov *et al.*, 2001; Platt *et al.*, 1996). Además recientemente se ha descrito que el factor transcripcional MeaB activa la expresión de *nmrA* en presencia de fuentes preferidas de nitrógeno (Wong *et al.*, 2007). En el caso de Nit2, no existe ni regulación autógena de su transcripción ni control de la estabilidad del transcrito por parte de la fuente nitrogenada. Así, Nmr1 podría ser un inhibidor más potente de la función de Nit2 que NmrA de la de AreA.

### 6.1.2. Gat1, Gln3, Dal80 y Gzf3 en *S. cerevisiae*

En la levadura *S. cerevisiae*, incapaz de asimilar nitrato, la utilización de otras fuentes de nitrógeno secundarias está sujeta también a RCN. Al igual que en hongos filamentosos, el mecanismo de RCN está mediado por factores transcripcionales de tipo GATA (Coffman *et al.*, 1997; Cooper, 2002; Magasanik y Kaiser, 2002; Springael *et al.*, 2003; Oliveira, *et al.*, 2005; Magasanik 2005). En este caso son cuatro los factores

GATA implicados: Gln3 y Gat1/Nil1 son activadores transcripcionales, mientras que Dal80/Uga43 y Deh1/Gzf3/Nil2 actúan como represores transcripcionales, estando todos ellos interconectados en un complejo circuito regulador. La integración de las acciones de ambos tipos de factores se alcanza gracias a su regulación cruzada y autógena (figura 4). Tres de los cuatro factores GATA (Gat1, Dal80 y Gzf3/Deh1) están codificados por genes que contienen múltiples secuencias GATA en sus promotores y su expresión es sensible a RCN (Coffman *et al.*, 1997; Soussi-Boudekou *et al.*, 1997). La expresión de *DAL80* y de *GAT1* depende de Gln3 y de regulación autógena. Sin embargo, la regulación de Gzf3 por parte de Gln3 es muy débil. Su expresión es regulada por Dal80 y requiere al menos uno de los dos factores GATA activadores. Este complejo mecanismo de regulación garantiza la perfecta coordinación entre los distintos factores de la que depende la regulación de los genes sujetos RCN puesto que Dal80 y Gzf3 compiten con Gat1 y Gln3 por la unión a los elementos GATA presentes en sus promotores (Minehart y Magasanik, 1991; Blinder y Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1996; Coffman *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2003).



**Figura 4. Mecanismo de acción de los factores transcripcionales tipo GATA sobre los genes afectados por la represión catabólica por nitrógeno (RCN) en *S. cerevisiae*.** Las líneas acabadas en punta de flecha indican efecto positivo sobre la expresión del gen. Las líneas acabadas en barra indican efecto negativo sobre la expresión del gen (adaptado de Georis, 2008).

## 6.2. Papel de Ure2 en la regulación de la asimilación del nitrógeno en levaduras

Además de estos cuatro factores transcripcionales la expresión génica relacionada con el catabolismo del nitrógeno está negativamente regulada por el producto del gen *ScURE2* (ScUre2). Esto se pone de manifiesto en los mutantes  $\Delta ure2$ , donde se produce un aumento de la expresión de los genes sensibles a RCN.

Este regulador interacciona negativamente con *GLN3* y con *GAT1* en presencia de fuentes preferidas de nitrógeno (Bertram *et al.*, 2000; Blinder *et al.*, 1996; Kulkarni *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2000, Cunningham *et al.*, 2000). El mecanismo de acción propuesto para ScUre2 indica que en presencia de fuentes de nitrógeno preferentes, ScUre2 es capaz de “secuestrar” a Gln3 y posiblemente Gat1 en el citoplasma, impidiendo que entren al núcleo e inhibiendo de esta forma la activación transcripcional mediada por estos factores transcripcionales. Cuando estas fuentes de nitrógeno escasean, o en presencia de fuentes de nitrógeno alternativas, la función de Ure2 es inhibida de tal forma que Gln3 y posiblemente Gat1 pueden acceder al núcleo, unirse a los elementos GATA situados en los promotores de los genes sensibles a RCN y activar su expresión (Cunningham *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 2000, Cunningham *et al.*, 2000). La regulación ejercida por Ure2 se basa en la formación de un complejo con Gln3 (Kulkarni *et al.*, 2001). En células que están creciendo en un medio con una fuente de nitrógeno preferida, Gln3 se encuentra en el citoplasma en forma fosforilada y unido a Ure2. El cambio de las células a un medio con una fuente nitrogenada no preferida conlleva la inmediata liberación de Gln3 fosforilado de Ure2, su desfosforilación y su translocación hacia el núcleo celular (figura 5).

## 6.3. Cascada de señalización mediada por TOR

Ure2 y los factores GATA forman parte de la única vía de señalización conocida que actúa sobre el metabolismo del nitrógeno y que implica la participación de las quinasas TOR (*Target of Rapamycin*). Las quinasas TOR son quinasas de serina y treonina altamente conservadas desde levaduras hasta mamíferos que desempeñan un papel central en el control del crecimiento de células eucariotas (Wullschleger *et al.*, 2005). Son miembros de la superfamilia de quinasas de 3 fosfatidil inositol (PI-3K), las cuales regulan el crecimiento celular y la diferenciación en respuesta a nutrientes. Su

actividad es inhibida por el macrólido lipofílico rapamicina, producido por *Streptomyces hygroscopicus*. La acción de la rapamicina está mediada por su unión a la prolil isomerasa FKBP12. Se emplea en la práctica clínica por su actividad antifúngica, inmunosupresora y anticancerígena.

La vía de señalización mediada por TOR, conservada desde levaduras hasta mamíferos, coordina señales nutricionales y mitogénicas. Controla el crecimiento celular activando procesos anabólicos como la síntesis proteica, la transcripción y la biogénesis de los ribosomas e inhibiendo procesos catabólicos como el recambio proteico y la degradación de mRNA. Esta vía parece regular a diferentes factores transcripcionales en función de la calidad y la cantidad de diferentes nutrientes, incluyendo fuentes de nitrógeno y carbono. Sin embargo, se desconoce el modo en que TOR detecta y discrimina entre los distintos nutrientes para generar una respuesta apropiada en una condición dada (Hardwick *et al.*, 1999; Rohde *et al.*, 2001).

En *S. cerevisiae* hay dos proteínas TOR, TOR1 y TOR2. TOR se encuentra en dos complejos estructural y funcionalmente distintos, TORC1 y TORC2. TORC1 contiene TOR1 o TOR2, Kog1, Tco89 y Lst8. TORC2 contiene TOR2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y Lst8. Ambos TORC1 y TORC2 son esenciales pero sólo TORC1 es inhibido por rapamicina. TORC1 controla el crecimiento celular mediante una rama de señalización sensible a rapamicina que regula la transcripción, la traducción, la toma de nutrientes, la biogénesis de los ribosomas y la autofagia. TORC2 controla la organización de la actina, la endocitosis y la biosíntesis de lípidos a través de una cascada de señalización insensible a rapamicina (Loewith *et al.*, 2002; Wullschleger *et al.*, 2005; Wullschleger *et al.*, 2006).

Entre los cambios transcripcionales inducidos por las proteínas TOR está la inducción de la expresión de los genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas. Las proteínas TOR previenen la expresión de estos genes, impidiendo la localización nuclear de Gln3 mediante su asociación con Ure2 en el citoplasma de la célula. De acuerdo con el modelo de regulación de las kinasas TOR (figura 5) en presencia de una fuente preferida de nitrógeno la fosfatasa Sit4 forma un complejo con Tap42 (*Tor associated protein*) y con el complejo TORC1 permaneciendo inactiva y, por tanto, es incapaz de desfosforilar a Gln3. Bajo estas condiciones, Gln3 permanece en el citoplasma y la expresión de los genes sujetos a RCN es reprimida. Si el nitrógeno escasea o si las células son tratadas con rapamicina, el complejo Sit4-Tap42

se separa de TORC1 y se activa. Gln3 es entonces desfosforilado, entra en el núcleo y activa la expresión de los genes sensibles a RCN. El citado modelo se encuentra en continua revisión dada la aparición constante de nuevas evidencias, a menudo contradictorias, y de nuevos componentes involucrados, que sugieren que el modelo de regulación es bastante más complicado. Por ejemplo, se sabe que la fosfatasa PP2A está involucrada en la localización nuclear de Gln3 inducida por rapamicina, en condiciones represoras (Tate *et al.*, 2009) pero no en respuesta a la escasez de nitrógeno. Ésta y otras observaciones sugieren que el grado en que la rapamicina imita unas condiciones de crecimiento desrepresoras es limitado (Tate *et al.*, 2009).

A pesar de que los primeros estudios realizados mostraron que Gat1, el segundo activador transcripcional, responde a la fuente de nitrógeno y a la rapamicina de forma similar a Gln3 (Coffman *et al.*, 1995; 1996; Stanbrough y Magasanik, 1995), un análisis más detallado ha puesto de manifiesto evidentes diferencias respecto a Gln3 en cuanto a su mecanismo de regulación. Como se comentó anteriormente, una de las diferencias más aparentes en la regulación de estos dos factores GATA tiene lugar a nivel transcripcional. Así la expresión de *GAT1* es sensible a RCN, dependiente de Gln3, activada de forma autógena y reprimida por los factores GATA represores Dal80 y Gzf3. Gln3, por su parte, es inmune a todos estos mecanismos de regulación transcripcional. Además, recientemente se ha visto que la regulación por parte de TOR de Gln3 y Gat1 se bifurca a nivel de su localización celular y su unión al ADN. Por un lado, Ure2, ejerce una regulación negativa más extrema sobre la localización celular de Gln3 que sobre la de Gat1 (Georis *et al.*, 2008; Tate *et al.*, 2010), resultado que parece estar de acuerdo con la incapacidad de aislar un complejo Ure2-Gat1. Por otro parte, la unión al ADN de Gat1 no depende únicamente de su retención citosólica sino también de su secuestro en el núcleo por parte de Gzf3 (Georis *et al.*, 2009). Más aún, la localización celular de Gln3 responde mayoritariamente a los niveles de nitrógeno intracelulares como refleja su fuerte sensibilidad a RCN y su débil respuesta al tratamiento con rapamicina, mientras que la localización de Gat1 depende principalmente de TOR como refleja su débil sensibilidad a RCN y su fuerte respuesta a rapamicina. Además, ambos factores dependen en diferente grado de las fosfatasas Sit4 y PP2A para su localización nuclear tanto en respuesta al tratamiento con rapamicina como a condiciones de desrepresión (Tate *et al.*, 2010).

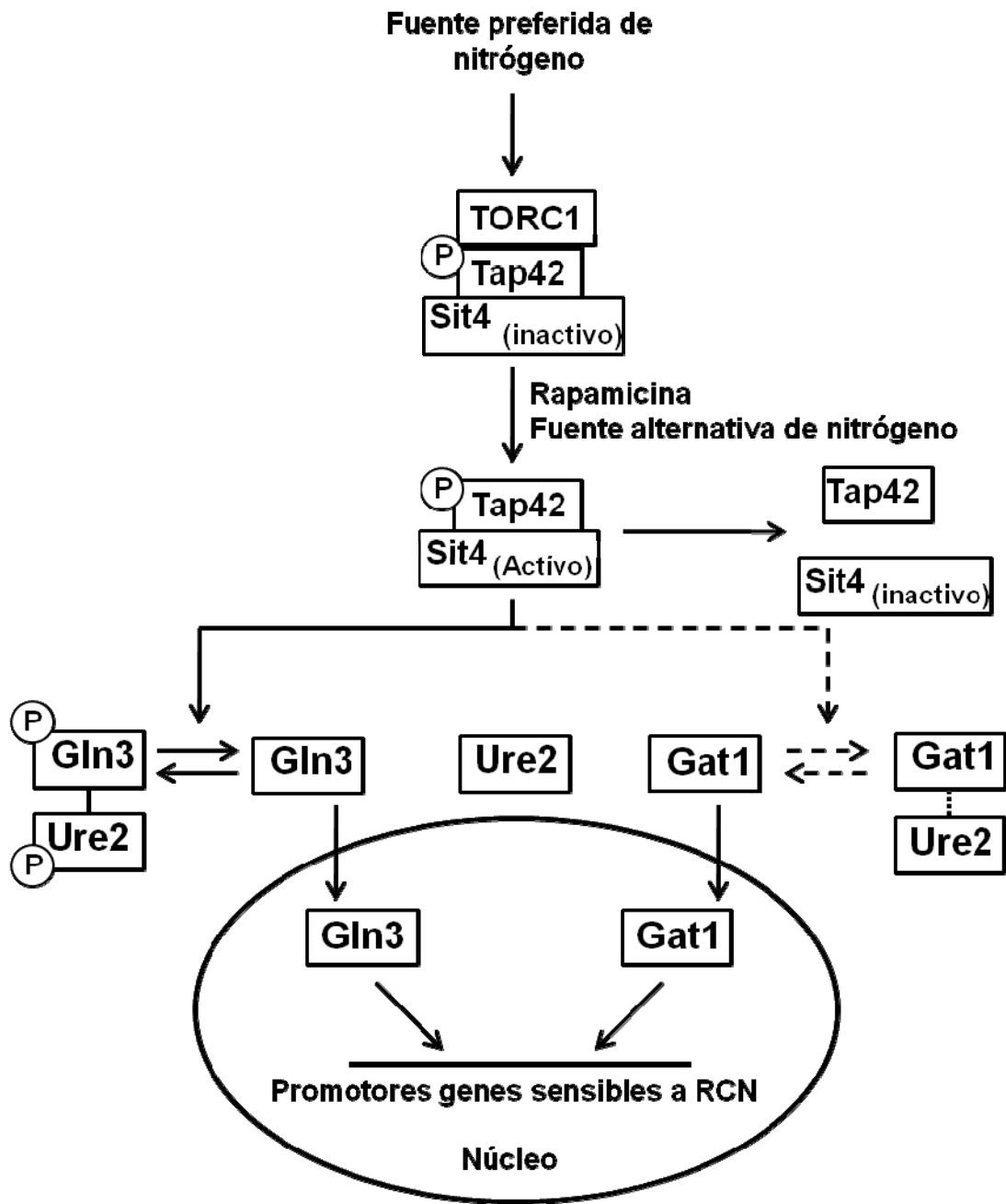


Figura 5. Modelo de regulación de la desfosforilación y localización de Gln3 (y Gat1) y de la activación de la transcripción de los genes sensibles a RCN mediada por la vía Tor. Adaptado de Georis, 2008 y Tate, 2006.

## 7.1 Homeostasis catiónica: Papel del potencial electroquímico

Cationes mono y divalentes como el  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , etc., juegan un importante papel en el correcto funcionamiento de las células eucariotas. Así por ejemplo, los iones  $Na^+$  son necesarios para la función de ciertas enzimas (Page y Di Cera, 2006). A pesar de ello, para la mayoría de las células eucariotas, una concentración intracelular elevada de  $Na^+$  resulta perjudicial, probablemente porque interfiere con el correcto funcionamiento de ciertas dianas celulares (Serrano, 1996). Debido a la abundancia del  $Na^+$  en los ambientes naturales, las levaduras y otros muchos organismos eucariotas han desarrollado mecanismos para mantener una concentración intracelular relativamente baja de este catión. Uno de los mecanismos que determina la entrada de éste y otros cationes es el potencial de membrana, parámetro biofísico del que depende asimismo la entrada de nutrientes y de  $K^+$ . En *S. cerevisiae*, los mayores determinantes del potencial de membrana son la  $H^+$ -ATPasa, Pma1, generador de potencial eléctrico y el sistema de transporte de alta afinidad Trk1,2 consumidor de potencial. Se asume que la actividad relativa de ambos sistemas determina el valor del potencial eléctrico modulando la actividad de sistemas de transporte secundarios que incluye aquellos relacionados con la entrada de nutrientes y cationes tóxicos (figura 6) (Goosens *et al.*, 2000). Debido a su papel modulando el balance osmótico e iónico así como en la entrada de nutrientes, la bomba de protones Pma1 está sometida a un fino mecanismo de regulación. La glucosa es una señal importante en su regulación. Dicha regulación ocurre a dos niveles: un rápido incremento inicial en la actividad catalítica (Serrano, 1983), que afecta tanto a la  $K_m$  (que disminuye) como a la  $V_{max}$  (que aumenta) seguida por una segunda fase en la que tiene lugar un lento y moderado incremento en la expresión del gen inducido por los factores transcripcionales Rap1 y Gcr1 (Portillo, 2000). La fosforilación de ciertos residuos específicos resulta en una mayor o menor actividad de la  $H^+$ -ATPasa dependiendo del residuo. Así, la proteína quinasa Ptk2, está implicada en la activación de Pma1 mediante la fosforilación de la Ser899. Por el contrario, la fosforilación de Pma1 por la proteína quinasa CK1 en la Ser507 produce un descenso en su actividad (Estrada *et al.*, 1996). Los mutantes deficientes en Ptk2 presentan una menor actividad  $H^+$ -ATPasa y un fenotipo de tolerancia a  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mn^{2+}$ , TMA, higromicina B y norespermidina. Se postula que los mutantes *ptk2* tienen un potencial de membrana menor y que los diversos transportadores de cationes son dependientes de voltaje. Así, activando Pma1,

Ptk2 aumenta el potencial de membrana (Goossens *et al.*, 2000). De esta forma el potencial se vuelve más negativo dentro lo que determina la entrada de cationes tóxicos mediada por diferentes sistemas de transporte. Ptk2 pertenece a una familia de kinasas de levaduras dedicadas a la regulación de transportadores de membrana. Entre ellas se incluye Hal4 y Hal5, reguladores positivos de los transportadores de  $K^+$ , Trk1 y Trk2. La sobreexpresión de *HAL4* y *HAL5* aumenta la tolerancia de las células a  $Na^+$  y  $Li^+$  mientras que su mutación produce un incremento en la sensibilidad a cationes. Tanto los mutantes *hal4*, *hal5* como *trk1* y *trk2* son deficientes en la entrada de  $K^+$ , su crecimiento es sensible a diversos cationes incluyendo  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , TMA, higromicina B, bajo pH y muestran un incremento en la entrada de tetrametilamonio (Mulet *et al.*, 1999). Estos resultados llevaron a pensar en la activación directa de los sistemas Trk mediante fosforilación por parte de dichas kinasas. Sin embargo, evidencias más recientes muestran que Hal4 y Hal5 podrían no estar implicadas en la actividad de Trk1 sino en la estabilidad del transportador en la membrana bajo condiciones de bajo  $K^+$ , previniendo su endocitosis y degradación vacuolar (Perez-Valle *et al.*, 2007).

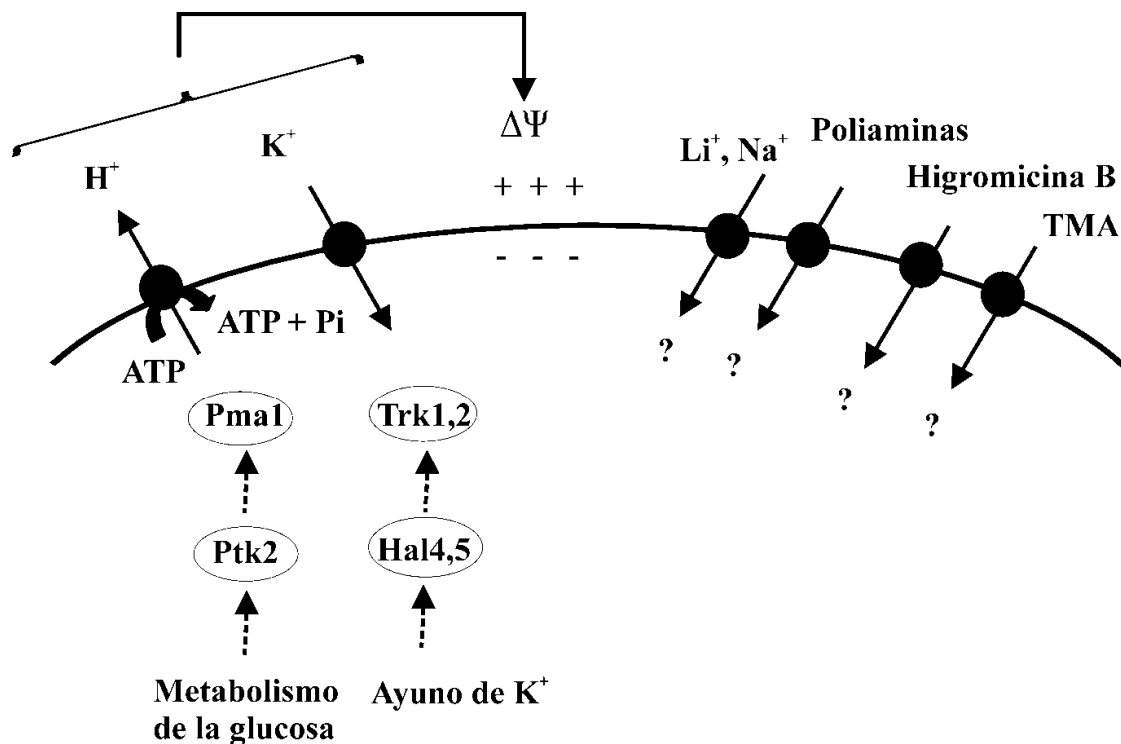


Figura 6. Papel de Pma1 y Trk1,2 en la tolerancia a sales en levaduras mediante regulación del potencial de membrana (extraído de Goossens, 2000).



## 7.2 Homeostasis catiónica: Papel y regulación de la Na<sup>+</sup>-ATPasa Ena1

Por otra parte, el mantenimiento de bajos niveles intracelulares de Na<sup>+</sup> cuando éste está presente en exceso en el medio externo radica en gran medida en la capacidad de excretar este catión. El principal determinante de la detoxificación de Na<sup>+</sup> es la ATPasa de tipo P codificada por el gen *ENA1*, que se encuentra sujeta a un complejo y sofisticado sistema de regulación transcripcional en respuesta a cambios ambientales específicos.

Aunque los primeros trabajos realizados en *S. cerevisiae* sugerían regulación post-traducciona l de *ENA1* (Wieland *et al.*, 1995) todas las evidencias recopiladas indican que la regulación de la función Na<sup>+</sup>-ATPasa en la célula se basa principalmente en el control de la expresión del gen. Así su expresión es rápidamente inducida en respuesta a altas concentraciones de Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> o a pH alcalino. La exposición a sales, a estrés osmótico o a un pH elevado causa la activación de diversas vías de señalización que son integradas por el promotor de *ENA1* (figura 7) (Ariño *et al.*, 2010; Ruiz y Ariño, 2007).

Además de la toxicidad salina, la exposición de las levaduras a concentraciones extracelulares relativamente bajas de NaCl (≈0,4M) provoca una situación de estrés osmótico. La activación de la vía HOG (*high-osmolarity glycerol*) en respuesta a la elevada osmolaridad externa resulta en la fosforilación y activación de la protein kinasa activada por mitógeno Hog1 (de Nadal *et al.*, 2002). Hog1 regula *ENA1* a través de uno de sus dianas, el factor transcripcional bZip Sko1. Sko1 actúa como represor uniendo el complejo corepresor Ssn6-Tup1 al elemento de respuesta a AMP cíclico (cAMP response element: CRE) presente en el promotor de *ENA1* (Proft y Serrano, 1999). En respuesta a estrés osmótico Hog1 fosforila a Sko1 en su región N-terminal provocando la disociación del complejo represor Sko1-Ssn6-Tup1. Por el contrario, la fosforilación de Sko1 cerca del dominio bZip por la proteín kinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) incrementa su efecto represor (Proft *et al.*, 2001).

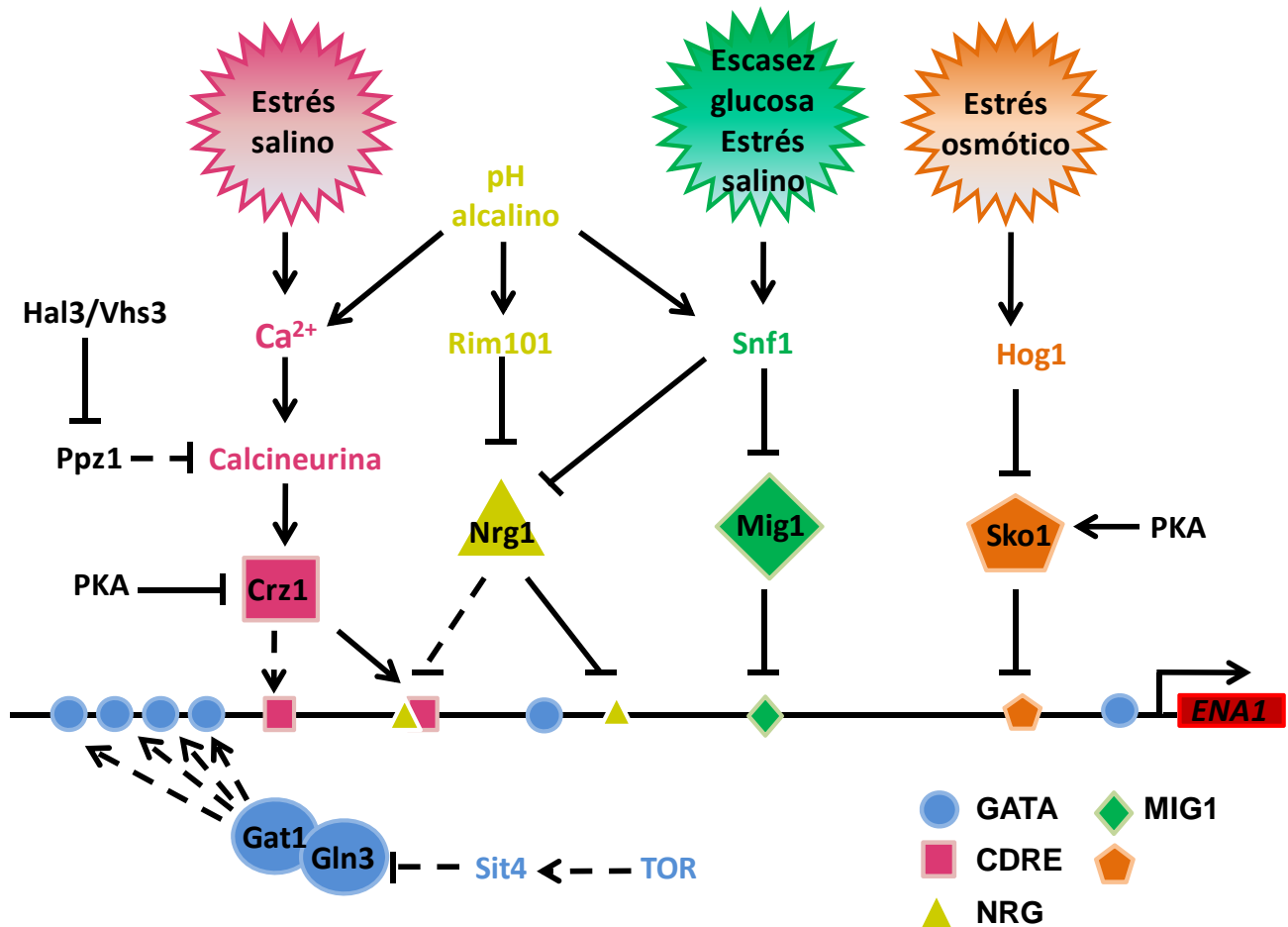
La exposición de las células a elevadas concentraciones salinas o pH alcalino provoca un rápido incremento de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico que resulta en la activación de la calcineurina. La activación de la calcineurina induce la expresión de más de 160 genes a través de la desfosforilación y entrada en el núcleo del factor transcripcional Crz1 (Matheos *et al.*, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998; Stathopoulos y

Cyert, 1997) que se une a secuencias específicas, conocidas como elementos de respuesta dependientes de calcineurina (CDRE). En el caso de *ENAI* existen dos secuencias de unión en las posiciones -813/-821 y -729/-727, siendo el elemento más cercano a la ORF el más importante para la inducción del gen (Mendizabal *et al.*, 2001). La fosforilación de Crz1 por la protein kinasa A (PKA) promueve su salida del núcleo. (Kafadar y Cyert, 2004). Aproximadamente el 40 % de la respuesta transcripcional frente a pH alcalino está mediada por la activación de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2002; Platara *et al.*, 2006), en este caso como resultado de la entrada casi inmediata de  $Ca^{2+}$  extracelular al citosol a través del canal de  $Ca^{2+}$ , Cch1-Mid1. (Iida *et al.*, 1994; Viladewall *et al.*, 2004). El estrés alcalino induce asimismo al factor transcripcional Rim101 que controla la expresión de *ENAI* a través de la proteína represora Nrg1 (Lamb *et al.*, 2001).

Por último, la expresión de *ENAI* está regulada por la calidad de los nutrientes presentes en el medio. El tratamiento de las levaduras con rapamicina incrementa de forma transitoria la expresión de *ENAI* y dicha respuesta requiere la presencia de Gln3 y Gat1. Así, la ausencia de estos factores de transcripción provoca una disminución de la expresión de *ENAI* en condiciones de inducción por sales (Crespo *et al.*, 2001). Además,  $\Delta gln3$  y  $\Delta gat1$  son muy sensibles a  $Na^+$ , y su ausencia elimina la tolerancia a sales del mutante  $\Delta ure2$ . Estas observaciones están de acuerdo con la evidencia previa de que mutaciones en *URE2* suprimen la sensibilidad de mutantes calcineurina a los cationes  $Na^+$  y  $Li^+$ , debido a que dicha sensibilidad está causada en parte por una expresión reducida de *ENAI* (Withee *et al.*, 1998). De acuerdo con todas estas observaciones en el promotor de *ENAI* se han identificado seis putativos motivos GATA, lo que sugiere que el estrés salino podría activar a Gln3 y Gat1, promoviendo su entrada en el núcleo, e induciendo la expresión de *ENAI*. A pesar de estas evidencias, la regulación de *ENAI* por la vía TOR no está exenta de controversia. Así por ejemplo, la exposición a estrés salino en condiciones en que Gln3 normalmente se encuentra en el núcleo como es el ayuno de nitrógeno resulta en una rápida relocalización del factor transcripcional en el citoplasma (Tate y Cooper, 2007).

Por otra parte, la expresión de *ENAI* es mayor en fuentes de carbono desrepresoras, como la galactosa o la rafinosa, que en glucosa (Alepez *et al.*, 1997; Ríos *et al.*, 1997). La represión mediada por glucosa se basa en el elemento  $URS_{MIG-ENAI}$  que sirve como sitio de reconocimiento para el complejo Mig1/2-Ssn6-Tup1 (Proft y

Serrano, 1999). La activación de la protein quinasa Sfn1 en medios con baja glucosa podría prevenir la represión mediada por el complejo aunque también se ha propuesto que Sfn1 podría regular la expresión de *ENA1* a través del represor Nrg1 (Ye *et al.*, 2008). En resumen, la inducción de *ENA1* por estrés salino incluye al menos tres vías diferentes: la vía Sfn1, la vía de la calcineurina y la vía TOR, siendo Crz1 y los factores GATA, Gat1 y Gln3, los reguladores positivos.



**Figura 7. Regulación de la expresión de *ENA1* por estrés salino y alcalino en *S. cerevisiae*.**

Los símbolos representan sitios de regulación conocidos o putativos. El promotor no se ha representado a escala pero se han respetado las posiciones relativas de los sitios de regulación. Las líneas discontinuas denotan interacciones que no han sido completamente verificadas. (extraído de Ariño, 2010).

Aparte de *Ena1*, existe un segundo mecanismo de excreción de  $\text{Na}^+$ , el antiporte  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  codificado por el gen *NHA1*, el cual es capaz de intercambiar  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  e incluso  $\text{K}^+$  por protones (Prior *et al.*, 1996; Banuelos *et al.*, 1998, Banuelos *et al.*, 2002). *NHA1* codifica una proteína de membrana que media la salida de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y otros cationes alcalinos. *Nha1* realiza el antiporte principalmente de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , sin embargo presenta un amplio rango de especificidad por sustrato. Se ha sugerido que *Nha1* tiene una función dual dependiente del pH del medio, así a pH ácido mantiene la concentración intracelular de cationes usando el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana para eliminar el exceso de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , y a pH alcalino regula el pH citosólico (Wadskog y Lennart, 2003).

### 7.3 La calcineurina en *S. cerevisiae*

La calcineurina es una fosfatasa de proteínas de residuos Ser/ Thr dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina que participa en multitud de procesos celulares y en la transducción de señales dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En *S. cerevisiae*, la calcineurina es una fosfatasa de proteínas heterodimérica compuesta por una de las dos subunidades catalíticas redundantes (codificadas por *CNA1/CMP1* y *CNA2/CMP2*) y una única unidad reguladora (codificada por *CNBI*) (Cyert *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Cyert y Thorner, 1992). Los genes calcineurina A codifican proteínas que contienen un dominio catalítico homólogo a otras fosfatasas de proteínas serina/treonina y tres dominios reguladores situados en su extremo C-terminal que distingue a la calcineurina de otros miembros de la familia. Estos dominios han sido identificado como dominio de unión a la calcineurina B (CNB binding) (Clipstone *et al.*, 1994; Guerini *et al.*, 1992; Husi *et al.*, 1994; Sikkink *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995) dominio de unión a la calmodulina (Guerini *et al.*, 1992; Kincaid *et al.*, 1988) y dominio autoinhibitorio (Hashimoto *et al.*, 1990) que se une al sitio activo en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ / calmodulina inhibiendo a la enzima. Los extremos N- y C-terminal son altamente variables entre especies así como entre las isoformas de calcineurina A dentro del mismo organismo (Kincaid, 1993; Guerini y Klee, 1991). Los genes calcineurina B contienen varios motivos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  denominados “EF-hands” (Kakalis *et al.*, 1995). Cada EF-hand consiste en dos hélices alfa perpendiculares de 10 a 12 aminoácidos con un *loop* central de 12 residuos con el que interacciona el  $\text{Ca}^{2+}$ . En los motivos “EF-hands” los residuos 1, 3, 5, 7, 9 y 12 proporcionan el oxígeno que actúa como ligando necesario para la unión del  $\text{Ca}^{2+}$ . La

variación en la afinidad por el calcio depende de la composición en las posiciones 1, 3, 5, 7 y 9. En la mayoría de estos dominios la posición 12 está ocupada por un glutámico.

En *S. cerevisiae* la calcineurina participa entre otros procesos en la regulación de las bombas e intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}$  responsables de la homeostasis del calcio. El número de transportadores que mantienen la homeostasis celular de  $\text{Ca}^{2+}$  en levaduras es relativamente pequeño. Estos transportadores mantienen la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) entre 50 y 200 nM cuando el rango de concentración en el medio externo es de  $< 1 \mu\text{M}$  a  $>100 \text{ mM}$  (Cunningham y Fink, 1994a; Davis, 1995). Entre los transportadores nos encontramos con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa vacuolar Pmc1 (Cunningham y Fink, 1994b), el intercambiador vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  Vcx1/Hum1 (Cunningham y Fink, 1996; Pozos *et al.*, 1996), la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa reticular Cod1/Spf1 (Cronin *et al.*, 2002) y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa Pmr1 situada en Golgi (Antebi y Fink, 1992; Rudolph *et al.*, 1989; Sorin *et al.*, 1997). Además otros transportadores iónicos influyen indirectamente sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Es el caso de la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar que proporciona la fuerza protón motriz necesaria para el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del intercambiador iónico  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  Vcx1 (Garret-Englele *et al.*, 1995; Hemenway y Heitman, 1999; Tanida *et al.*, 1995). Cuando el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio es elevado, la calcineurina activa la expresión de las dos ATPasas responsables de la disminución de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  *PMCI* y *PMRI*. La primera se encuentra en la vacuola (Cunningham y Fink, 1994b) mientras que la segunda participa en la vía secretora y se localiza en Golgi (figura 8) (Rudolph *et al.*, 1989). Ambas ATPasas pertenecen a la familia de las ATPasas de tipo P. Su nombre hace referencia a su mecanismo de transporte ya que un grupo fosfato es alternativamente añadido y eliminado de un residuo de aspartato para efectuar el transporte de los distintos iones. Dicho aspartato se encuentra en una secuencia de aminoácidos altamente conservada (DKTGTLT), firma de la familia (Catty *et al.*, 1997; Moller *et al.*, 1996). Mutantes con cualquiera de los dos genes interrumpidos son incapaces de crecer en medios con altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . La inactivación de la calcineurina bien por interrupción del gen o bien mediante tratamiento con ciclosporina o FK506 restablece el crecimiento del mutante  $\Delta\text{pmc1}$  o del doble mutante  $\Delta\text{pmc1pmr1}$  en alto  $\text{Ca}^{2+}$  (Cunningham y Fink, 1994b), indicando que la activación de la calcineurina en estas cepas podría tener un efecto negativo en el crecimiento. Por otra parte, el nivel de activación de Vcx1 se ve ligeramente reducido en condiciones de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la represión ejercida por la activación de la calcineurina a nivel postraduccional (Cunningham y Fink, 1996).

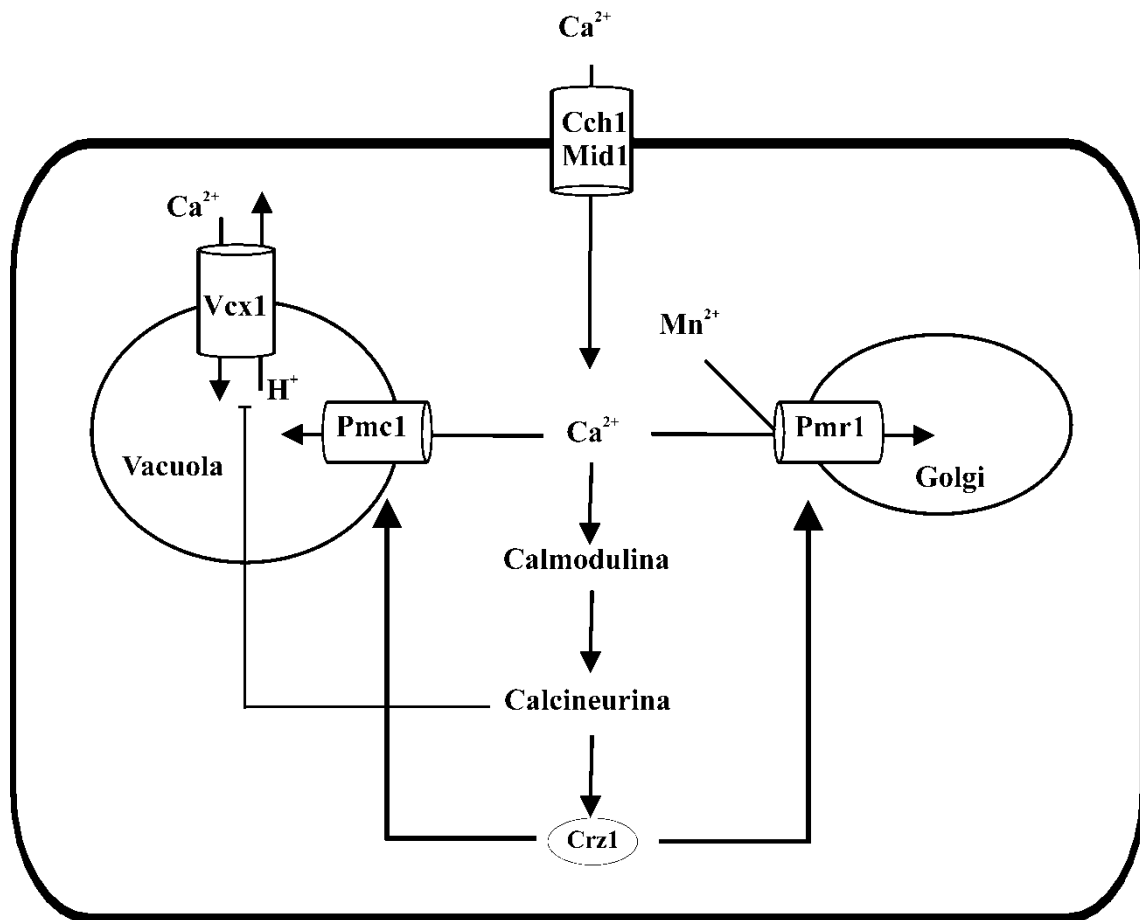


Figura 8. Regulación de las ATPasas y antiportes de  $\text{Ca}^{2+}$ , responsables de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , por la calcineurina (Modificado de Rusnak, 2000).

### 8. RCN en *H. polymorpha*.

En *H. polymorpha* se han aislado los genes *HpGLN3* y *HpGAT1*, ortólogos de *ScGLN3* de *S. cerevisiae* y de *ScGAT1* de *S. cerevisiae* y *areA* de *A. nidulans*, respectivamente (Tejera, 2003; Medina, 2009). La caracterización fenotípica de cepas de *H. polymorpha* afectadas en estos genes, puso en evidencia que *HpGat1* está implicado en la regulación de la vía de asimilación de nitrato en la levadura. Los resultados obtenidos mostraron que la mutación del gen *HpGAT1* iba acompañada de una disminución importante (aproximadamente del 80% respecto a la cepa silvestre) de la actividad nitrato reductasa desarrollada tras la incubación en nitrato. Estudios previos realizados por nuestro grupo (Navarro *et al.*, 2003) han permitido descartar el efecto que

el nitrato y el amonio ejercen en la regulación postranscripcional de la enzima. La regulación de los niveles de proteína nitrato reductasa en *H. polymorpha* es fundamentalmente transcripcional: el nitrato se comporta como un inductor de la expresión del gen *YNRI*, mientras que el amonio actúa como represor, incluso en presencia de nitrato. En base a lo anterior, la disminución de la actividad nitrato reductasa observada en cepas carentes del gen *HpGAT1* se debería a una menor transcripción de los genes de la vía de asimilación de nitrato, lo que posiciona a Gat1 como efector positivo de la regulación del gen *YNRI*. La homología que el producto del gen *HpGAT1* comparte con factores transcripcionales del tipo GATA implicados en la desrepresión de fuentes de nitrógeno primarias en hongos y levaduras apoya este supuesto. Sin embargo, a diferencia de lo que cabría esperar según el modelo de acción de *S. cerevisiae*, *HpGln3* apenas tiene efecto sobre la expresión y la actividad de los genes implicados en la asimilación de nitrógeno.

Por otra parte, en *H. polymorpha* se ha identificado un factor transcripcional nuevo: *HpGAT2* y un único represor: *HpGZF3*. *HpGat2* es un activador de la transcripción que presenta una elevada similitud con *HpGat1*. *HpGZF3* guarda homología con *ScDAL80* y con *ScDEH1/GZF3* y tal como ocurre en *S. cerevisiae*, su expresión se ve poco influenciada por el resto de factores del sistema, si bien es sensible a los cambios de fuente de nitrógeno del medio.

Respecto a la implicación de estos factores en la homeostasis catiónica se ha comprobado que en la zona no codificante del gen *ENAI* de *H. polymorpha* también existen sitios de unión para factores GATA. Al igual que *S. cerevisiae*, esta levadura se ha mostrado como un modelo útil para el estudio de la resistencia celular a iones de metales, tales como el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , etc, ya que es capaz de crecer normalmente a concentraciones de estos iones que resultan tóxicas para otros organismos (Manazzu *et al.*, 1998) por lo que el estudio de la homeostasis catiónica es viable.

Junto con estos cuatro factores transcripcionales se identificó el gen *HpURE2* ortólogo de *ScURE2*. La caracterización fenotípica de una cepa de *H. polymorpha* afectada en *HpURE2*, puso en evidencia que tal como ocurre en *S. cerevisiae* *HpUre2* participa en el mecanismo de RCN. Como se puede apreciar en la tabla 1, la actividad nitrato reductasa observada en  $\Delta ure2$  tras la incubación en un medio con mezcla nitrato-amonio, se ve incrementada en un 150 % con respecto a la cepa WT. De acuerdo con los niveles de actividad, la expresión del gen *YNRI* en nitrato-amonio fue mayor en

$\Delta ure2$  (tabla 2) lo que indica que la RCN bajo estas condiciones está casi abolida en  $\Delta ure2$ . Sin embargo, los valores de actividad nitrato reductasa observados en  $\Delta ure2$  tras la incubación en nitrato como única fuente de nitrógeno disminuyen en torno al 15 % respecto a la cepa silvestre. En cuanto a la expresión de los genes de la vía de asimilación *YNRI*, *YNII* e *YNTI*, ésta disminuye en todos los casos en la cepa mutante lo que sugiere que en presencia de nitrato, los genes no están completamente desreprimidos aún en ausencia de *URE2* (Rodríguez *et al.*, 2010). Estos resultados permiten concluir que *Ure2* participa en el mecanismo de RCN en *H. polymorpha*, aunque la menor expresión de los genes *YNTI*, *YNII* e *YNTI* otorgan a *Ure2* además un papel positivo. Estas evidencias sugieren la existencia de un mecanismo de regulación de los genes sujetos a RCN en *H. polymorpha* diferente al existente en *S. cerevisiae* que será objeto de estudio en el presente trabajo.

	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
<b>WT</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b><math>\Delta ure2</math></b>	<b>85 ± 27.4</b>	<b>258 ± 50.4</b>
<b><math>\Delta ure2 URE2</math></b>	<b>115 ± 14.2</b>	<b>116 ± 31.5</b>
<b>nURE2</b>	<b>105 ± 36.6</b>	<b>37.7 ± 20.1</b>

**Tabla 1: Actividad NR de las cepas WT,  $\Delta ure2$ ,  $\Delta ure2URE2$  y nURE2.** Los ensayos se realizaron tras 2 horas de incubación en medio con 5 mM de  $\text{NaNO}_3$  o 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  más 5 mM  $\text{NaNO}_3$ . El 100 % de actividad de la cepa WT corresponde a  $20.9 \pm 7.5$  y  $8.9 \pm 4.2$   $\text{nmol nitrito} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg of proteína})^{-1}$  en células incubadas en nitrato, y amonio más nitrato, respectivamente.



	<i>*Δure2</i>		<b>**WT</b>	
	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
<i>YNRI</i>	0.7	4	9700	240
<i>YNII</i>	0.5	4	N.D.	N.D.
<i>YNTI</i>	0.6	4	N.D.	N.D.
<i>GAPI</i>	1.2	1	3	1
<i>URE2</i>	0	0	5	2

**Tabla 2. Análisis de la expresión de los genes de asimilación de nitrato en las cepas WT y  $\Delta ure2$ .** Los ensayos se realizaron tras 2 horas de incubación en 5 mM de  $\text{NaNO}_3$  o 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  más 2.5 mM  $\text{NaNO}_3$ . La expresión relativa se determinó mediante qRT-PCR. \* La expresión está normalizada con respecto al WT en el mismo medio. \*\* La expresión está normalizada con respecto a amonio.

Por otra parte, la comparación de la secuencia aminoacídica de HpUre2 con las secuencias presentes en las bases de datos puso de manifiesto, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, la similitud existente entre la proteína de *H. polymorpha* y diversas glutatión S-transferasas, enzimas implicadas en la detoxificación de gran número de compuestos, principalmente compuestos xenobióticos de naturaleza hidrofóbica.

## 9. Glutatión S-transferasas y detoxificación.

Los xenobióticos son compuestos de origen no biológico, producto de las actividades humanas y de descomposición lenta. Entre ellos encontramos los fungicidas, insecticidas, fármacos, carcinógenos y agentes mutagénicos. La habilidad que tienen los organismos para sobrevivir a estas amenazas químicas posiblemente representan una adaptación biológica fundamental para permanecer en la naturaleza. Las células poseen un gran conjunto de enzimas capaces de transformar una amplia variedad de compuestos con diferentes estructuras químicas y funciones, reduciendo o eliminando su toxicidad. La detoxificación enzimática de xenobióticos tiene lugar en 3 fases. La primera fase tiene como fin la introducción de un grupo funcional, lo cual se conoce

como activación. Este proceso implica reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis. Las enzimas de la fase II catalizan la conjugación de los xenobióticos activados con sustratos endógenos solubles como glutatión reducido (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystenil-glicina o GSH), ácido glucurónico, sulfato, glucosa o glicina. Las enzimas responsables de la formación de conjugados con GSH (GS-X) son las glutatión S-transferasas (GST). Finalmente, en la fase III dichos compuestos glutatiónilados son expulsados del citoplasma por bombas localizadas en la membrana plasmática de células animales y en las membranas vacuolares de las levaduras. En el caso de las levaduras se han descrito dos bombas de expulsión: la bomba GS-X dependiente de ATP, Ycf1 (Ishikawa, 1992) y el transportador Bpt1 (Sharma *et al.*; 2002).

La base funcional de la actividad catalítica de las GST es su capacidad para unir GSH y para disminuir el pK<sub>a</sub> de su grupo sulfidrilo (-SH) de 9.0 a 6.5 aproximadamente. Una vez el anión tiolato (GS<sup>-</sup>) se forma en el sitio de unión GST, es capaz de reaccionar espontáneamente por ataque nucleofílico con los compuestos xenobióticos electrofílicos. Así la catálisis mediada por GST ocurre gracias a la capacidad combinada de la enzima para (1) unir GSH y promover la formación de GS<sup>-</sup> y (2) unir compuestos electrofílicos hidrofóbicos en un lugar próximo (Mannervik, 1985).

### **9.1. Clasificación de las GST**

La gran variedad de proteínas con actividad GST y su presencia a lo largo de toda la escala evolutiva hace que su clasificación resulte compleja e, incluso, confusa. Existen cuatro superfamilias de GST: canónicas, mitocondriales, microsomales y fosfomicina/glioxilasa (Oakley, 2005; Pearson, 2005). La superfamilia de las canónicas es la más extensa y a ella pertenecen las enzimas solubles o citosólicas que están involucradas en la transformación de los tóxicos xenobióticos. Las GST citosólicas están divididas a su vez en clases designadas como Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta y Omega en base a su estructura y actividad. La clase theta, progenitora de las demás, es la más diversa (Rossjohn, *et al.*, 1996). Esta distinción en clases se ha hecho con base en la clasificación de las GST citosólicas de mamíferos y rige la clasificación en otros organismos.

Algunas clases de GST, además de su actividad transferasa dependiente de GSH, también poseen actividad glutatión peroxidasa (GPx) y pueden catalizar la reducción

dependiente de GSH de hidroperóxidos de ácidos grasos, hidroperóxidos de fosfolípidos e hidroperóxidos orgánicos no fisiológicos como el hidroperóxido de cumeno. Las GPx, junto con otras enzimas, metabolizan las especies reactivas de oxígeno o ROS que se producen principalmente durante la fosforilación oxidativa. Las glutatión peroxidasas son enzimas cuyas funciones se solapan con las GSTs y otras enzimas que unen glutatión como las glutaredoxinas (Sheehan *et al.* 2001; Armstrong 1997; Mannervick *et al.* 1998). Estas familias de enzimas comparten un dominio tioredoxina de unión a GSH aunque su estructura y mecanismo de acción son distintos (Saito *et al.* 1999; Nay *et al.* 1999; Labrou *et al.* 2001; Caccuri *et al.* 2002). La caracterización de las GSTs, glutaredoxinas y glutatión peroxidasas en *S. cerevisiae* ha revelado cierta redundancia de función entre las diferentes clases de enzimas (Choi *et al.* 1998; Collinson y Grant 2003; Collinson *et al.* 2002; Avery y Avery 2001). La versatilidad de las enzimas que unen GSH y su tendencia a presentar funciones solapantes podría contribuir significativamente a la capacidad de los organismos para adaptarse al cambio.

## 9.2. GST en hongos y levaduras

Se conoce relativamente poco acerca de la presencia y papel biológico de las GST en levaduras y hongos. Sin embargo, se conocen isoformas y existen estudios sobre estas enzimas en *S. cerevisiae* (Choi *et al.*, 1998), *S. pombe* (Kim *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Veal *et al.*, 2002), *A. nidulans* (Fraser *et al.*, 2002), entre otros organismos. En *S. cerevisiae* se han caracterizado dos genes denominados *GTT1* y *GTT2*, que codifican dos GST funcionales (Choi *et al.*, 1998). Estas proteínas comparten aproximadamente un 50 % de similitud con GST de otros organismos y tienen actividad sobre el sustrato CDNB. *A. nidulans* también expresa una GST denominada *gstA* que se sobreexpresa en presencia de CDNB y peróxido de hidrógeno y tiene un papel importante en la resistencia a metales pesados (Fraser *et al.*, 2002). En *S. pombe* las 3 GST identificadas, codificadas respectivamente por los genes *gst1*, *gst2* y *gst3* se inducen bajo estrés oxidativo.

Adicionalmente se han encontrado mediante análisis bioinformático diferentes secuencias similares a GST en distintas especies de hongos y levaduras. Una de esas secuencias es la del gen *URE2*. Así, *Ure2* de *S. cerevisiae* presenta similitud con distintas GST (Coshigano and Magasanik 1991) a excepción de ciertos residuos catalíticos implicados en la actividad GST, conservados entre todos los miembros de la

superfamilia de las GST y ausentes en ScUre2. Por su parte, la proteína de *S. cerevisiae* incluye entre los residuos 267-295 una región denominada “clip” ausente en las GST. Esta región “clip” es una estructura en forma de lazo que se extiende desde el corazón del dominio GST y que parece estar implicada en la interacción de Ure2 con los factores necesarios para el establecimiento de la regulación por nitrógeno (Baudin-Baillieu *et al.*, 2003). La homología existente entre las GST y la proteína ScUre2 excluye el extremo N-terminal esta última. Este extremo N-terminal, localizado entre los residuos 1-94, de la proteína de *S. cerevisiae* es responsable de la conversión de Ure2 a su forma priónica *in vivo* y de la formación de fibrillas amiloides *in vitro* (Masison y Wickner, 1995; Taylor *et al.*, 1999; Thual *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004).

La ausencia en ScUre2 de algunos residuos catalíticos conservados entre los miembros de las GST junto con el hecho de que nunca haya sido posible determinar una actividad glutatión S-transferasa típica asociada a la misma, hizo dudar durante mucho tiempo de la participación de esta proteína en los procesos de detoxificación. Sin embargo, poco a poco se ha verificado el papel del Ure2 de *S. cerevisiae* en detoxificación mediante varias aproximaciones. Por un lado, mediante una aproximación genética, es decir, mediante el estudio de la sensibilidad de la cepa  $\Delta ure2$  a metales y a compuestos causantes de estrés oxidativo se ha demostrado que Ure2 participa en la detoxificación de Ag(I), As(III), As(V), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cr(VI) Cu(II), Fe(II), Hg(II), Ni(I), Se(IV), diamida y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rai *et al.* 2003; Rai y Cooper, 2005; Todorova *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha visto que Ure2 presenta actividad glutatión peroxidasa frente al peróxido de hidrógeno y a hidroperóxidos orgánicos como el hidroperóxido de cumeno y el tert-butilhidroperóxido (Bai *et al.* 2004). Estudios más recientes han demostrado mediante la realización de mutagénesis dirigida que el residuo Asn124 es importante para la actividad GPx de Ure2. Asimismo las mutaciones puntuales A122C y N124A/V hicieron posible la detección de actividad GST. No ocurrió lo mismo con las sustituciones N124S/Y/C a pesar de ser los residuos equivalentes a Asn124 en otras GST. De forma llamativa la ganancia en los niveles de actividad GST se vio acompañada en la pérdida en los niveles de actividad GPx lo que parece indicar que se requiere un posicionamiento de los sustratos diferente para cada tipo de actividad (Zhang *et al.*, 2008). Finalmente, Ure2 muestra actividad glutaredoxina (Zhang y Perret, 2009).

*gstA*, glutatión S-transferasa de *A. nidulans* perteneciente a la clase theta, presenta similitud con *URE2* de *S. cerevisiae*, si bien no participa en la represión catabólica por nitrógeno. Esta proteína contribuye a la resistencia frente a gran variedad de compuestos xenobióticos y metales pesados. Con respecto al CDNB, la cepa mutante no presenta diferencias de crecimiento con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, la incubación de un cultivo de *A. nidulans* en presencia de dicho compuesto produce una fuerte activación de la transcripción del gen (Fraser *et al.*, 2002).

#### 9.4. HpUre2 y su similitud con las GST

La proteína HpUre2 comparte un porcentaje de identidad del 37 % (52 % homología) con la proteína GstI de *S. pombe* así como un 36 % (51 % de homología) con la GstII perteneciente a esta misma levadura. La identidad es del 33 % (48 % de homología) con la proteína GstA del hongo filamentoso *A. nidulans* perteneciente a la clase theta y de un 35 % (49 % de homología) con la proteína GST1 del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. La homología se extiende también a otras proteínas del tipo GST fundamentalmente de origen bacteriano, aún no caracterizadas. La comparación con la base de datos SWISS Prot reveló la homología compartida por la proteína de *H. polymorpha* con diferentes GST, especialmente con las GST de la clase phi presentes en plantas así como con las GST existentes en distintas especies de *Drosophila*.

La homología de la proteína Ure2 de *H. polymorpha* con la proteína de *S. cerevisiae* excluye el extremo N-terminal de esta última. Dicho extremo (entre los aminoácidos 1-94) rico en asparagina y glutamina es considerado como un dominio priónico, esto es, con capacidad para la formación *de novo* y propagación de [URE3], la forma priónica de Ure2 (Wickner *et al.*, 1995). El extremo C-terminal de la proteína, región sobre la que recae la función reguladora por nitrógeno así como la actividad GST de ScUre2 es capaz de desempeñar su función sin el extremo N-terminal (Masison *et al.*, 1997).

# *Objetivos*

---

## II. OBJETIVOS

Los estudios sobre la asimilación de nitrato llevados a cabo en levaduras, hongos, plantas y algas no han contestado aún las cuestiones referentes a cómo la célula eucariota siente el nitrato y cómo, en base a dicha señal, se genera la respuesta celular consistente en la activación de los genes necesarios para su utilización. Los estudios realizados en hongos filamentosos y levaduras han permitido conocer únicamente los factores transcripcionales implicados en esa activación por nitrato, pero nada se conoce acerca de la ruta señalizadora que conduce la señal de nitrato hasta los promotores de los genes que participan en su asimilación.

La transcripción de los genes de la ruta de asimilación de nitrato responde a dos señales esenciales, la primera, la ausencia de fuentes preferentes de nitrógeno (señal de desrepresión) mediada por el mecanismo de RCN y la segunda, la presencia de nitrato (señal de inducción). La identificación en *H. polymorpha* de Ure2 y de cuatro factores transcripcionales tipo GATA (HpGat1, HpGat2, HpGzf3 y HpGln3) sugieren que el mecanismo de regulación de la asimilación de nitrógeno se encuentra más próximo al descrito en *S. cerevisiae* que al de hongos filamentosos como *A. nidulans* y *N. crassa*, a pesar de que estos hongos son capaces de usar el nitrato como única fuente de nitrógeno como es el caso de *H. polymorpha*. Sin embargo, la menor actividad nitrato reductasa de una cepa  $\Delta$ ure2 así como la menor expresión génica de los genes implicados en la asimilación de nitrato respecto a una cepa WT en nitrato, indican que dichos genes no se desreprimen en ausencia de Ure2 y, por tanto, evidencian la existencia de un mecanismo diferente de regulación de la vía en el que Ure2 podría tener un papel clave. Es por ello, que el trabajo de investigación tiene como punto de partida la caracterización de Ure2, si bien no se ha centrado únicamente en su papel en la asimilación de nitrógeno sino también en la homeostasis catiónica. En base a lo descrito anteriormente como objetivo principal se propone elucidar la ruta de señalización que regula los genes responsables del metabolismo del nitrógeno y de la tolerancia a sales en *H. polymorpha* con el fin de generar un modelo que integre a Ure2 y a los factores transcripcionales del tipo GATA implicados. A este objetivo principal, se suman otros objetivos sobre los que se ha trabajado a lo largo de esta tesis.

Por tanto, los objetivos planteados fueron:

1. Caracterización del papel de Ure2 y de los factores GATA en el metabolismo del nitrógeno.
2. Determinación del papel de Ure2 y de los factores GATA en la homeostasis catiónica. Establecimiento del mecanismo de regulación de la  $\text{Na}^+$ -ATPasa Ena1 y de la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática Pma1.
3. Estudio del papel de Ure2 en los procesos de detoxificación de metales pesados y compuestos causantes de estrés oxidativo. Identificación de las actividades enzimáticas asociadas a Ure2 posiblemente involucradas en dichos procesos.
4. Caracterización del papel de Tep1 en la homeostasis catiónica y en otros procesos celulares.



# *Resultados y Discusión*

---

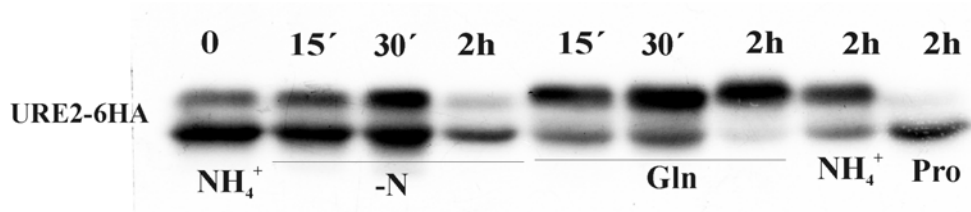
### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Papel de Ure2 en represión catabólica por nitrógeno

En *S. cerevisiae* Ure2 se desfosforila en respuesta a la limitación de nitrógeno coincidiendo con la desrepresión de los genes sensibles a RCN (Cardenas et al., 1999; Shamji et al., 2000; Crespo y Hall, 2002). Por tanto, la disponibilidad de nitrógeno regula la expresión de los genes de asimilación del nitrógeno regulando, entre otras cosas, el estado de fosforilación de Ure2 y, en consecuencia, modulando su interacción con Gln3. En *H. polymorpha* Ure2 participa también en RCN. Con el fin de estudiar la regulación de Ure2 en *H. polymorpha* analizamos su estado de fosforilación en respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno y a rapamicina.

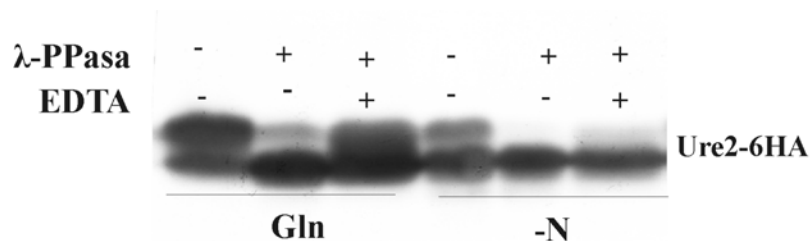
##### 1.1 La fosforilación de HpUre2 responde a la calidad de la fuente nitrogenada

La caracterización fenotípica de una cepa de *H. polymorpha* carente de *HpURE2*, puso en evidencia que tal como ocurre en *S. cerevisiae* HpUre2 participa en el mecanismo de RCN. Así, la actividad NR, el transporte de nitrato y la expresión génica de los genes del catabolismo del nitrógeno se ven incrementadas en una cepa  $\Delta ure2$  respecto a la cepa WT en un medio con nitrato más amonio (Tejera, 2003). Con el fin de seguir indagando en su papel en RCN nos preguntamos si HpUre2 es una fosfoproteína y, en tal caso, si su estado de fosforilación depende de la fuente nitrogenada presente en el medio. Para ello, se fusionó el epítipo HA a la proteína y se analizó mediante inmunoblot la movilidad electroforética de HpUre2 en respuesta a distintas fuentes nitrogenadas. Se observó que la movilidad electroforética de Ure2 varía en función de las condiciones nutricionales a las que se someten las células. La incubación en fuentes preferentes de nitrógeno como glutamina y amonio produjo la fosforilación de Ure2 mientras que la incubación en N-free o prolina promovió la desfosforilación de la proteína (figura 1).



**Figura 1. Fosforilación de Ure2 en distintas fuentes nitrogenadas.** Células crecidas hasta la fase exponencial en amonio (tiempo 0), se lavaron e incubaron en medio sin nitrógeno (-N), con glutamina 5 mM, amonio 5 mM o prolina 1 mM.

Para verificar que dicho retraso electroforético era debido a la fosforilación se tomaron extractos de proteínas procedentes de células incubadas en glutamina y en ausencia de nitrógeno (N-free) y se trataron con  $\lambda$ -proteína fosfatasa (figura 2). Se observó como en glutamina la banda superior de la señal de Ure2 desaparece casi por completo mientras que la inferior se hace más intensa. Esto no ocurre, sin embargo, cuando a la reacción se le añade EDTA, agente quelante del  $Mn^{2+}$ , que actúa como cofactor de la enzima. En N-free la banda mayoritaria es la inferior. La desaparición de la banda superior de la señal de Ure2 en extractos tratados con fosfatasa indica que el cambio de movilidad electroforética de Ure2 se debe a la fosforilación y que por tanto estamos ante una fosfoproteína.



**Figura 2. El comportamiento electroforético de Ure2-6HA se debe a la fosforilación.** Células crecidas en amonio se lavaron y transfirieron a un medio mínimo sin nitrógeno (-N) o con glutamina 5 mM donde se incubaron durante 2 horas. Los extractos se trataron con  $\lambda$ -proteína fosfatasa (indicado como  $\lambda$ -PPasa +). Donde se indica se añadió EDTA 50 mM a la reacción con fosfatasa.

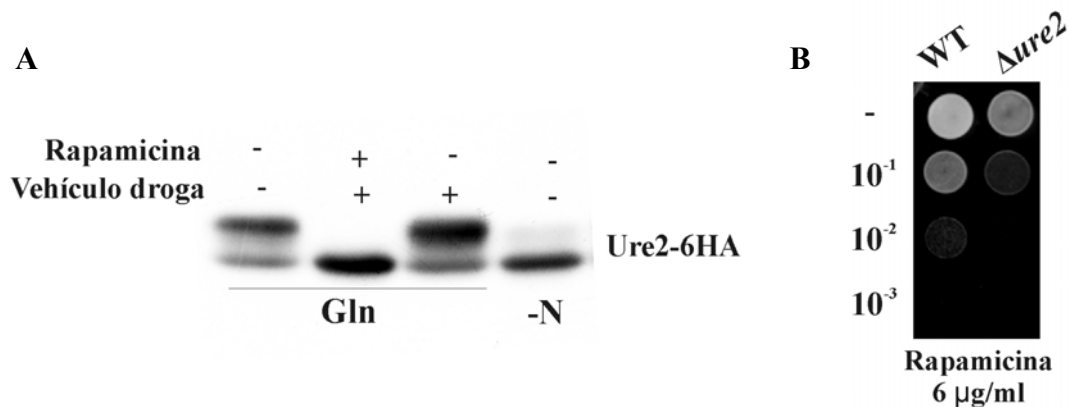
En resumen, Ure2 se fosforila en respuesta a fuentes nitrogenadas preferidas y se desfosforila bajo condiciones de ayuno de nitrógeno. Los resultados apuntan a que el estado de fosforilación de Ure2 podría modular su interacción con los factores GATA tal como ocurre en *S. cerevisiae*. Así, en su estado fosforilado Ure2 se encontraría unido a los factores GATA reteniéndolos en el citosol mientras que su desfosforilación conllevaría la liberación de los GATA y su acceso al núcleo.

## 1.2 Tor regula el estado de fosforilación de Ure2

La rapamicina es un macrólido lipofílico capaz de formar un complejo con la peptidil-propil isomerasa FKBP/Rbp1. Este complejo es un potente inhibidor de la actividad de las quinasas TOR (Heitman *et al.*, 1991), proteínas cuya perturbación tiene un efecto pleiotrópico en la célula. En *S. cerevisiae*, el tratamiento con rapamicina desencadena, entre otros efectos, la inducción de muchas enzimas y permeasas involucradas en el catabolismo del nitrógeno, respuesta similar a la que se produce por incubación en un medio pobre en nitrógeno. De ello se concluye que en presencia de un exceso de nitrógeno las proteínas TOR están activas inhibiéndose la expresión génica sensible a RCN, mientras que ante la escasez de nitrógeno o en presencia de rapamicina, las proteínas TOR están inactivas lo que conlleva el incremento en la expresión génica sensible a RCN. El factor GATA Gln3 es una diana de la vía de transducción de señal TOR. Así, la rapamicina, además de inducir la expresión génica, promueve la translocación de Gln3 al núcleo coincidiendo con la desfosforilación del factor transcripcional. El mismo efecto se observa en el estado de fosforilación de Ure2. Asimismo,  $\Delta ure2$  es hipersensible a rapamicina lo que demuestra que Ure2 también es una diana de la cascada de señalización TOR.

Con el fin de establecer una relación entre TOR y RCN en *H. polymorpha*, se realizaron experimentos centrados en estudiar el efecto de la rapamicina en los niveles de actividad NR en presencia de fuentes de nitrógeno reducidas (Navarro *et al.*, 2003). La rapamicina disminuyó la represión ejercida por la glutamina sobre los niveles de actividad nitrato reductasa de células incubadas en presencia de nitrato más glutamina demostrándose que la rapamicina suprime la RCN en *H. polymorpha*, de la misma forma que lo hace en *S. cerevisiae*. Por tanto, la rapamicina, al igual que en *S.*

*cerevisiae*, parece ser una herramienta excelente para estudiar la regulación dependiente de TOR así como para estudiar el efecto postraducciona de las fuentes nitrogenadas reducidas sobre Ure2. Por ello, estudiamos el efecto de la rapamicina sobre el estado de fosforilación de Ure2 en presencia de glutamina, observando la completa desfosforilación de la proteína al igual que ocurre cuando las células se someten a ayuno de nitrógeno (figura 3A). Además  $\Delta ure2$  fue sensible a rapamicina (figura 3B), lo que sugiere que Ure2 forma parte de la cascada de señalización mediada por TOR. Es importante destacar que fue necesario utilizar concentraciones de rapamicina muy superiores a las usadas en *S. cerevisiae* lo que pone de manifiesto la alta tolerancia de *H. polymorpha* a la droga.



**Figura 3. A. La rapamicina induce la desfosforilación de Ure2-6HA.** Células crecidas en amonio se incubaron durante 2h en ausencia de nitrógeno (-N) o en glutamina 5 mM en presencia o ausencia de rapamicina 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . **B.  $\Delta ure2$  es sensible a rapamicina.** Las cepas WT y  $\Delta ure2$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YPD con rapamicina a la concentración indicada. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

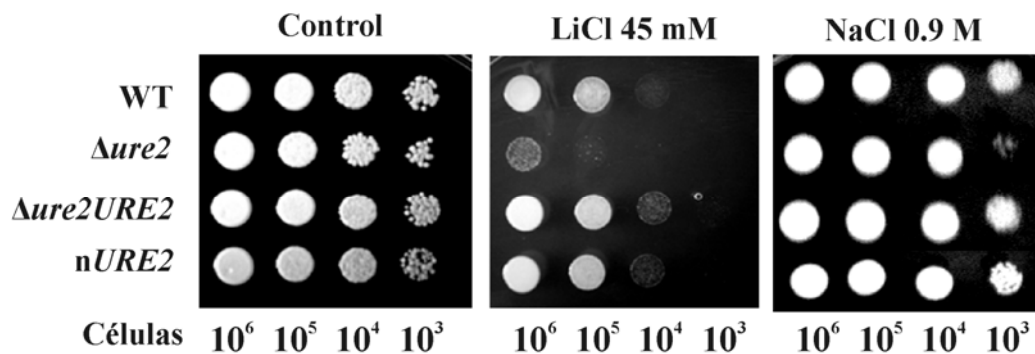
Estos resultados confirman la observación previa de que en *H. polymorpha* la vía TOR responde a la fuente de nitrógeno y regula la expresión de los genes de la asimilación de nitrógeno. En su conjunto estos resultados indican que el estado de fosforilación de Ure2 depende de la vía de señalización TOR que responde a su vez a la fuente nitrogenada.

## 2. Papel de Ure2 en la tolerancia a sales

Un primer análisis fenotípico de tolerancia a sales puso de manifiesto la sensibilidad de *HpΔure2* a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , en contraste a lo observado en *S. cerevisiae*. El fenotipo de sensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  se asocia a un incremento en las concentraciones citosólicas de estos cationes ya sea por la alteración del potencial electroquímico, por un aumento de la concentración de los mismos debido a defectos en los sistemas de salida o a defectos en la compartimentalización de los iones (Goffeau y Slayman, 1981; Perlin et al., 1988; Serrano, 1984). En este capítulo se propone el papel de Ure2 en la tolerancia a sales y los mecanismos involucrados.

### 2.1 Ure2 participa en la regulación del potencial electroquímico

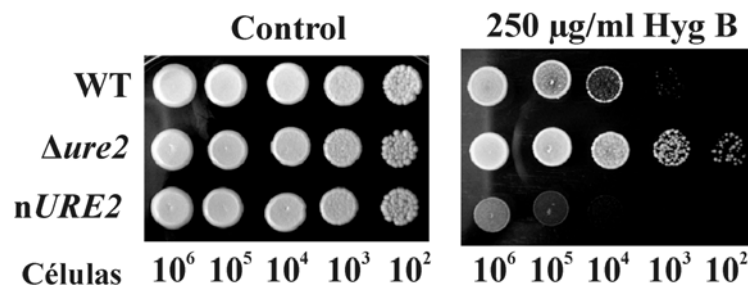
En *S. cerevisiae* Ure2 está involucrado en la tolerancia a sales. Así el mutante *Δure2* presenta una mayor resistencia al estrés salino. A diferencia de lo observado en *S. cerevisiae*, al realizar un test de crecimiento en placa en presencia de  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ , se observó una mayor sensibilidad de *HpΔure2* (figura 4). Este hecho nos condujo a estudiar el papel de *HpUre2* en la tolerancia a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ .



**Figura 4.** *Δure2* es sensible a  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Las cepas WT, *Δure2*, *Δure2URE2* y *nURE2* se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris, pH 5,5 con LiCl y NaCl a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Con el fin de determinar si la sensibilidad a sales de *Δure2* se debía a un aumento en la entrada de cationes estudiamos la relación de Ure2 y la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática Pma1, principal generador de potencial electroquímico. En

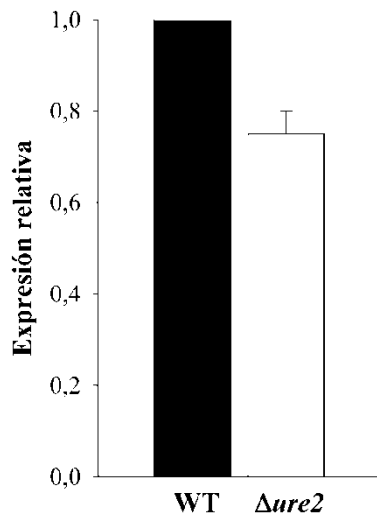
levaduras aquellas mutaciones que reducen la actividad de Pma1 producen sensibilidad a pH bajos y resistencia a higromicina B, aminoglicósido catiónico que inhibe la traducción. La tolerancia de los mutantes pma1 a drogas catiónicas se debe a una menor entrada en la célula debido a la existencia de un menor potencial de membrana. Por tanto, la existencia de un mayor potencial de membrana en  $\Delta ure2$  podría favorecer la entrada de sales y daría cuenta de su sensibilidad. En primer lugar estudiamos el comportamiento de  $\Delta ure2$  en presencia de higromicina B. El mutante  $\Delta ure2$  mostró una elevada tolerancia a la droga (figura 5) indicando la existencia de un potencial de membrana menos negativo y por tanto de una menor actividad  $H^+$ -ATPasa de membrana plasmática. Para verificarlo, medimos la actividad  $H^+$ -ATPasa en una cepa WT y en  $\Delta ure2$  observando que  $\Delta ure2$  presentaba un descenso del orden del 24% de la actividad respecto al WT (figura 6). Estos resultados sugerían que Ure2 estaba involucrado en la regulación de Pma1. En este punto nos preguntamos si dicha regulación se daría a nivel transcripcional. Por ello, determinamos mediante qRT-PCR los niveles de expresión del gen *HpPMA1* en ambas cepas. La ausencia de Ure2 produjo una disminución en la expresión de *PMA1* del orden del 30% (figura 7).



**Figura 5.  $\Delta ure2$  es resistente a higromicina B.** Las cepas WT,  $\Delta ure2$  y nURE2 se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris, pH 5,5 con higromicina B a la concentración indicada. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Cepa	Actividad H <sup>+</sup> -ATPasa	Actividad relativa (%)
WT	253 ± 71	100
<i>Δure2</i>	193 ± 38	76

**Figura 6. Actividad H<sup>+</sup>-ATPasa en las cepas WT y *Δure2*.** Los valores representan nmoles Pi \* min<sup>-1</sup> \* (mg de proteína)<sup>-1</sup> y corresponden a la media ± desviación estándar del ensayo realizado por triplicado.



**Figura 7. Análisis de la expresión del gen *HpPMA1*.** Los resultados muestran la expresión relativa del gen *HpPMA1* en una cepa silvestre y en *Δure2* determinada mediante qRT-PCR. Las células se crecieron en amonio y se resuspendieron en medio fresco donde se incubaron durante 2 horas. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes ± la desviación estándar.

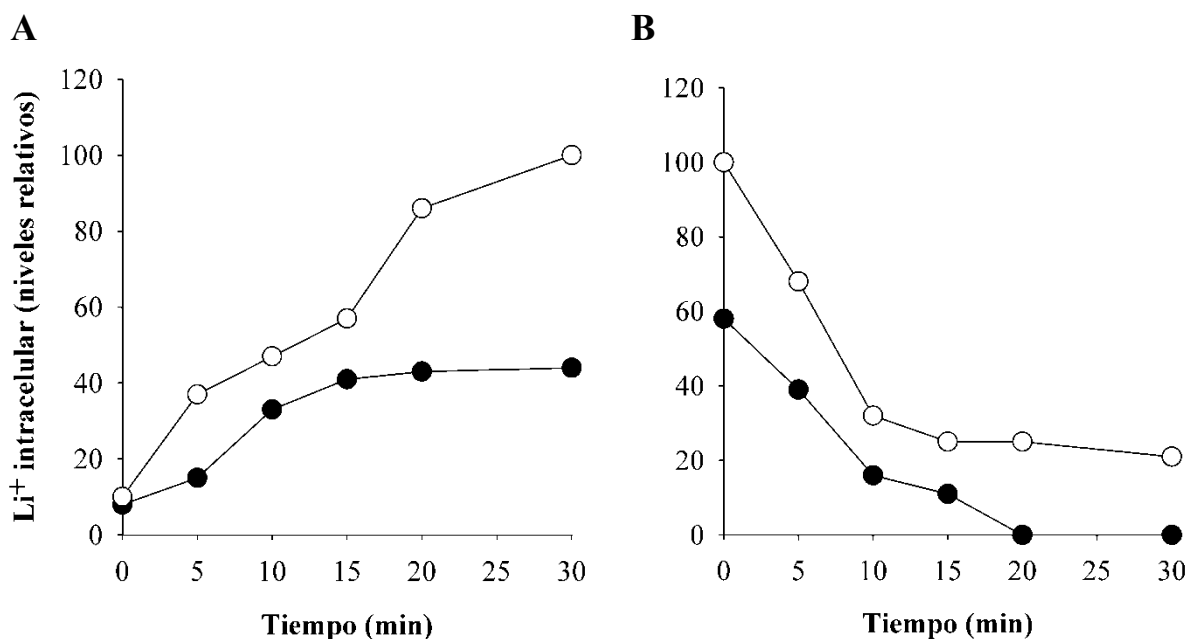
Los resultados expuestos indicaban que *Ure2* participa en la regulación transcripcional de *PMA1*. Así, su ausencia provoca el descenso de la actividad *Pma1* y favoreciendo presumiblemente la existencia de un menor potencial de membrana y la resistencia a la droga catiónica higromicina B. De estos resultados pudimos descartar que la sensibilidad a Li<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> se deba a una mayor entrada de los cationes en la célula ya que la misma estaría desfavorecida en la misma medida que la higromicina B.

## 2.2 *Ure2* regula la expresión de *ENAI*

Los resultados expuestos anteriormente apuntaban, por tanto, a la existencia de un defecto en la salida de cationes en *Δure2*. Con el fin de corroborar dicha hipótesis determinamos el contenido intracelular de Li<sup>+</sup> en el mutante y en la cepa silvestre con la finalidad de definir la cinética de entrada y salida de Li<sup>+</sup> en ambas cepas. En los



experimentos de entrada las células fueron expuestas a medios que contenían 30 mM de LiCl y se recogieron muestras a distintos intervalos de tiempo para la extracción y determinación del contenido intracelular de  $\text{Li}^+$  por espectrofotometría de emisión atómica. En los experimentos de salida, se incubaron las células en LiCl 30 mM durante 30 min, se lavaron y se resuspendieron en medio sin LiCl recoigiéndose igualmente alícuotas a distintos tiempos. El experimento de entrada mostró que  $\Delta ure2$  acumulaba  $\text{Li}^+$  más rápidamente que el WT. Asimismo, la cinética de salida mostró que  $\Delta ure2$  era incapaz de excretar  $\text{Li}^+$  en la misma medida que la cepa silvestre (figura 8).

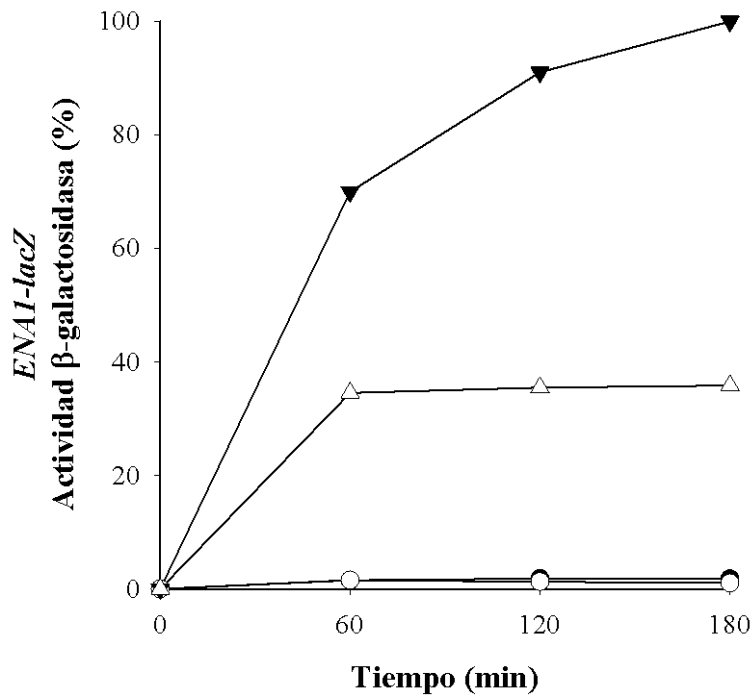


**Figura 8. La delección de *URE2* afecta al contenido intracelular de  $\text{Li}^+$ .** **A. Experimento de entrada.** Las células crecieron en YGAS tamponado con MES-Tris pH 5,5 hasta una  $\text{DO}_{660}$  de 0,6-1. Tras ser recogidas por centrifugación fueron resuspendidas en un medio que contenía 30 mM de LiCl. Se determinó el contenido intracelular de  $\text{Li}^+$  a los tiempos indicados. **B. Experimento de salida.** Las células incubadas durante 30 min con 30 mM de LiCl, se lavaron y resuspendieron en medio sin  $\text{Li}^+$  determinándose el  $\text{Li}^+$  intracelular. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes. WT (●);  $\Delta ure2$  (○).

Por tanto,  $\Delta ure2$  acumula  $\text{Li}^+$  más rápidamente que una cepa silvestre. Esto podría deberse a una mayor entrada de  $\text{Li}^+$ , hecho que se ha descartado midiendo el potencial de membrana, o bien a un defecto en la salida. Esta opción se ve apoyada por el comportamiento de  $\Delta ure2$  en los experimentos de salida, ya que la misma se

encuentra retardada en esta cepa, en comparación con la cepa silvestre. Por tanto, era de esperar que *Ure2* tuviese un efecto directo o indirecto sobre la expresión de los genes *ENAI* o *NHAI*.

Decidimos evaluar los posibles efectos de la mutación del gen *URE2* sobre la expresión de estos dos genes. Como se mencionó anteriormente, *ENAI* codifica una ATPasa de membrana de tipo P, capaz de bombear cationes alcalinos fuera de la célula, principalmente  $\text{Na}^+$  pero también  $\text{Li}^+$ . La expresión de *ENAI* es inducida por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y condiciones alcalinas. La salida de  $\text{Na}^+$  es mediada principalmente por *Ena1* especialmente a pH alcalino. Su delección conlleva hipersensibilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  (Wadskog y Lennart, 2003). *NHAI* codifica una proteína de membrana implicada principalmente en el antiporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Para determinar si en  $\Delta ure2$  la expresión de *ENAI* estaba afectada, medimos la expresión de *ENAI-lacZ* en un WT y en  $\Delta ure2$ . Se observó que los niveles de expresión de *ENAI* eran menores en la cepa mutante (figura 9). Los mismos resultados se obtuvieron mediante qRT-PCR. En cuanto a *NHAI* no obtuvimos diferencias significativas en los niveles de expresión en ambas cepas. Estos resultados indicaban que la menor expresión de *ENAI* en  $\Delta ure2$  era la responsable de una salida más lenta de  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ , de la concentración intracelular elevada de estos cationes y, como consecuencia, de su toxicidad en  $\Delta ure2$ . Por tanto, concluimos que *Ure2* participa en la tolerancia a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , regulando positivamente *ENAI*.

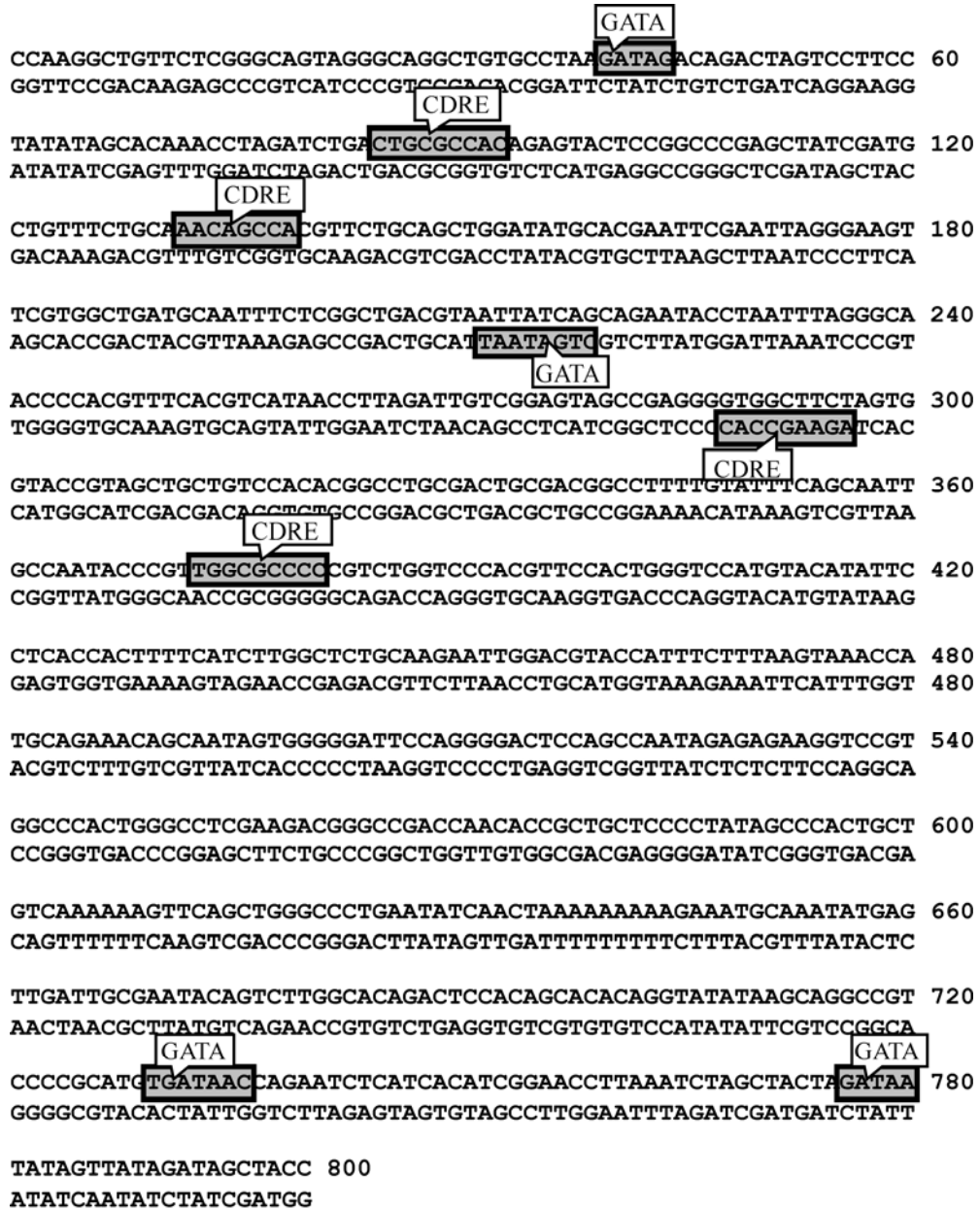


**Figura 9. Expresión de *ENAI* en las cepas WT y  $\Delta ure2$ .** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT y  $\Delta ure2$  que portan la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio. Se determinó la expresión de *ENAI* en la cepa WT (●) y  $\Delta ure2$  (○) incubadas en ausencia de NaCl y en la cepa WT (▼) y  $\Delta ure2$  (Δ) incubadas en NaCl 0.7 M durante 180 min. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

### 2.3 Ure2 participa en la respuesta dependiente de calcineurina

La inducción de *ENAI* por estrés salino incluye al menos tres vías diferentes: la vía Snf1, la vía de la calcineurina y la vía TOR, siendo Crz1 y los factores GATA, Gat1 y Gln3, los reguladores positivos (Ariño *et al.*, 2010). Los menores niveles de expresión de *ENAI* en  $\Delta ure2$  sugerían que la expresión de *ENAI* dependiente de la calcineurina y/o de los factores GATA podría estar negativamente afectada en  $\Delta ure2$ . Por ello, analizamos el promotor del gen *ENAI* en busca de los sitios de regulación conocidos de Crz1 y de los factores GATA. La existencia de datos experimentales en *S. cerevisiae* relacionados con las secuencias reconocidas por Crz1 nos permitieron realizar una búsqueda dentro de la región 5' no codificante del gen *ENAI* en busca de posibles regiones de unión de dichos factores transcripcionales (figura 10). Mediante el uso del programa “Regulatory Sequence Analysis Tools” ([rsat.ulb.ac.be/rsat](http://rsat.ulb.ac.be/rsat)) analizamos las

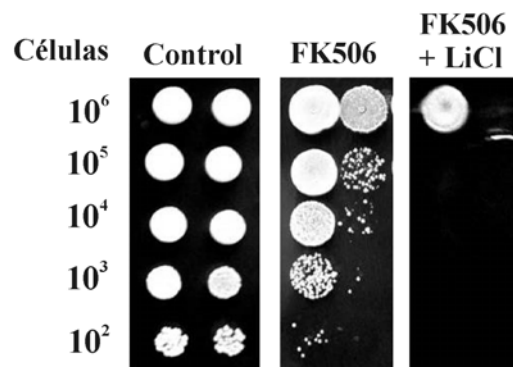
dos cadenas de la secuencia promotora (800 pb) en busca de secuencias CDRE y secuencias GATA usando la matriz de alineamiento basada en la secuencia cwmmGCCmC para CDRE y varias matrices en el caso de los GATA generadas por el promama Jaspar (<http://jaspar.cgb.ki.se/>).



**Figura 10. Secuencias CDRE y GATA identificadas en el promotor de *ENAI* mediante análisis bioinformático con el programa RSAT. Se analizan los 800 nucleótidos de la región 5' no codificante situados antes del codón de inicio del gen *ENAI*.**

El análisis bioinformático muestra cuatro secuencias putativas de unión para los factores GATA y Crz1, lo que sugiere que, tal como ocurre en *S. cerevisiae*, estos factores transcripcionales regulan la expresión del gen *ENA1*.

La localización celular de Crz1 depende del estado de activación de la calcineurina. La calcineurina activada desfosforila Crz1 promoviendo su entrada en el núcleo. La calcineurina se inhibe fuertemente por drogas inmunosupresoras como la ciclosporina A (CsA) y el FK506, que difunden al interior de las células y se unen a las inmunofilinas ciclofilina y FKBP12, respectivamente (Breuder *et al.*, 1994). Los complejos resultantes ciclofilina-CsA y FKBP12-FK506 son los responsables de la inhibición de la calcineurina. Muchos estudios han utilizado estas drogas inmunosupresoras para inhibir a la fosfatasa en diversos organismos como levaduras, hongos filamentosos, plantas y mamíferos con el fin de explorar su actividad biológica. Con esa misma finalidad, es decir, para estudiar su relación con Ure2 decidimos comparar el crecimiento de la cepa silvestre y de  $\Delta ure2$  en presencia de FK506. Se observó que  $\Delta ure2$  es muy sensible a este macrólido tanto en ausencia como en presencia de  $Na^+$  y  $Li^+$ , que incrementaron la sensibilidad de  $\Delta ure2$  al compuesto (figura 11).



**Figura 11.  $\Delta ure2$  es hipersensible a FK506.** Las cepas WT (izquierda) y  $\Delta ure2$  (derecha) se sembraron en placa mediante goteo en medio YPD con FK506 25  $\mu\text{g/ml}$  con o sin LiCl 30 mM. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Este resultado apuntaba a la existencia de una interacción directa o indirecta entre la calcineurina y Ure2 sugiriendo que en el mutante  $\Delta ure2$  podría existir *per se* una menor activación de la calcineurina. En *S. cerevisiae*, las cepas deficientes en

calcineurina presentan una serie de fenotipos conocidos como sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, SDS y tolerancia a Ca<sup>2+</sup> (Farcasanu *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1993; Tanida *et al.*, 1995; Withee *et al.*, 1998). La baja tolerancia a Mn<sup>2+</sup> se debe, al menos en parte, a una expresión reducida de *PMRI*, ATPasa de tipo P situada en Golgi que bombea a su interior Ca<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> (Antebi y Fink; 1992; Cunningham y Fink, 1996). La sensibilidad a SDS se debe a la falta de inducción del gen *FKS2* que codifica una glucano sintetasa, cuyo defecto provoca problemas en la pared celular (Ishihara *et al.*, 2007). La sensibilidad a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> esta causada, como se ha apuntado anteriormente, por la menor expresión de *ENAI* (Ferrando *et al.*, 1995; Mendoza *et al.*, 1994). Una menor actividad calcineurina en  $\Delta ure2$  generaría fenotipos similares a los observados en una cepa deficiente en calcineurina. Con el fin de comparar el crecimiento en placa de ambas cepas nos dispusimos a construir un mutante calcineurina.

En *S. cerevisiae*, la calcineurina es un heterodímero compuesto por una de las dos subunidades catalíticas redundantes Cna1 o Cna2 y una única unidad reguladora Cnb1 (Cyert *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Cyert y Thorner, 1992). La búsqueda en el genoma de *H. polymorpha* de posibles secuencias codificantes de estas subunidades dio como resultado la aparición de tres ORF que denominamos *HpCNA1*, *HpCNA2* y *HpCNB1*. La comparación de las secuencias aminoacídicas derivadas de los genes *HpCNA1*, *HpCNA2* y *HpCNB1* con las secuencias depositadas en las bases de datos, mediante el empleo del programa Blastp reveló una alta identidad con los genes presentes en otras levaduras. Con las proteínas de *S. cerevisiae*, HpCna1, HpCna2 y HpCnb1 comparten un 49 %, un 48 % y un 63 %, respectivamente. La figura 12 muestra el alineamiento aminoacídico de ScCna1 y HpCna1 así como los dominios estructurales de estas subunidades catalíticas. HpCnb1 presentó 4 dominios “EF-hands” al igual que la proteína de *S. cerevisiae* (figura 13).

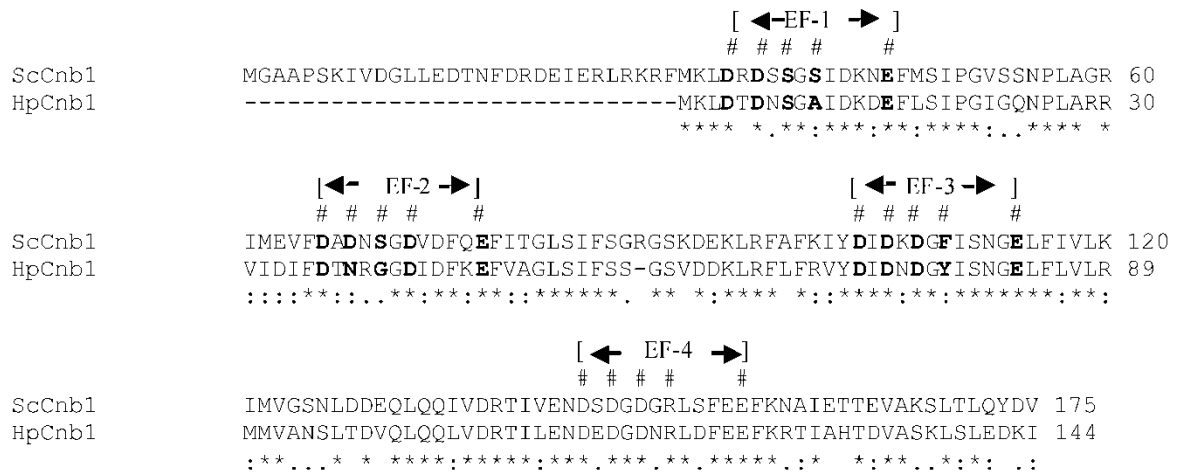
A



B

ScCna1	MSKDLNSSRIKIKPNDSD-----YIKVDRKQDLTKYELENGKVI STKDRPIASV	49
HpCna1	MMSFQTSFQISVHRFDSSSQLENVINQVKHRKTKQAGDPSVYTDLLGHTFCTRDRIVVDV	60
	* . *. : * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	PAITGKI PSDEEVFDSKTGLPNHSFLREHFFHEGRLSKEQAIKILNMSTVALSKEPNLLK	109
HpCna1	EPP TREMPGNDRVFANN-GLPDYKFLRRHFQEGRLSEEQVLRILEMAAAALRKEPNMVR	119
	. * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	LKAPITICGDIHGQYDLLKLFVGGDPAEIDYLFGLDYVDRGAFSFECLIIYLYSLKLN	169
HpCna1	VAAPVTVCGDVGQFYDLCKLFEICDDPDKTSYLFGLDYVDRGSYSLECLLLLYAMKINH	179
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	LGRFWMLRGNHECKHLTSYFTFKNEMLHKYDMEVDACCRSFNVLPLAALMNGQYFCVHG	229
HpCna1	PHTTFMLRGNHESEQMTSFFTKEECLKKHSLAVYEKSLESFKALPLAALMDGQFFCVHG	239
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	GISPCLKSVEDVNKINRFR-EIPSRGLMCDLLWADPVENYDDARDGSEFDQSEDEFV PNS	288
HpCna1	GISQHLRWLRDLKIDRFVANFPSSGLYCDLMWADPSNNYDSAT-----VEPNFVENY	292
	** * . * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	LRGCSFAFTFKASCKFLKANGLLSIRAHEAQDAGYRMYKNNKVTGFPSLITMFSAPNYL	348
HpCna1	ERGC SYMFSFRAVETFLKENGLLSVIRAHQAQDSGYRMYKQTAAQRFP SMITLFSAPNYC	352
	**** : * : * : * . *** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	DTYHNKAAVLKYEENVNIRQFHMSHPHYWLPDFMDVFTWVSLPFVGEKVTSM LVSILNLC	408
HpCna1	GT YGNKAAVLRYP SLMNIRQFGSQPEPYRLPNGLDAFTWSIPFVAERTSDILLQLNLC	412
	. ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	SEQELDPESEPKAAEETVKARANATKETGTPSDEKASSAI LEDETRRKALRNKILAIKAV	468
HpCna1	SAEELG-----GGTSEAEAEARP ID----YAALRKKILAIGRV	446
	* : * : * . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	SRMFSVLR ESEKVEYELKTMNAG-VLPRGALARGTEGLNETLSTFEKARKEDLINEKLPP	527
HpCna1	SRMFNMLREEAQKVEHLRTLGGDALPKGVLLDQDELDRKLSFEHARLADLPNEAMPR	506
	**** . : * : * : * : * : * : * . * . * : * : * : * : * : * : * : *	
ScCna1	SLSEVEQE KIKY YEKILKGA EKKPQL	553
HpCna1	K-----	507

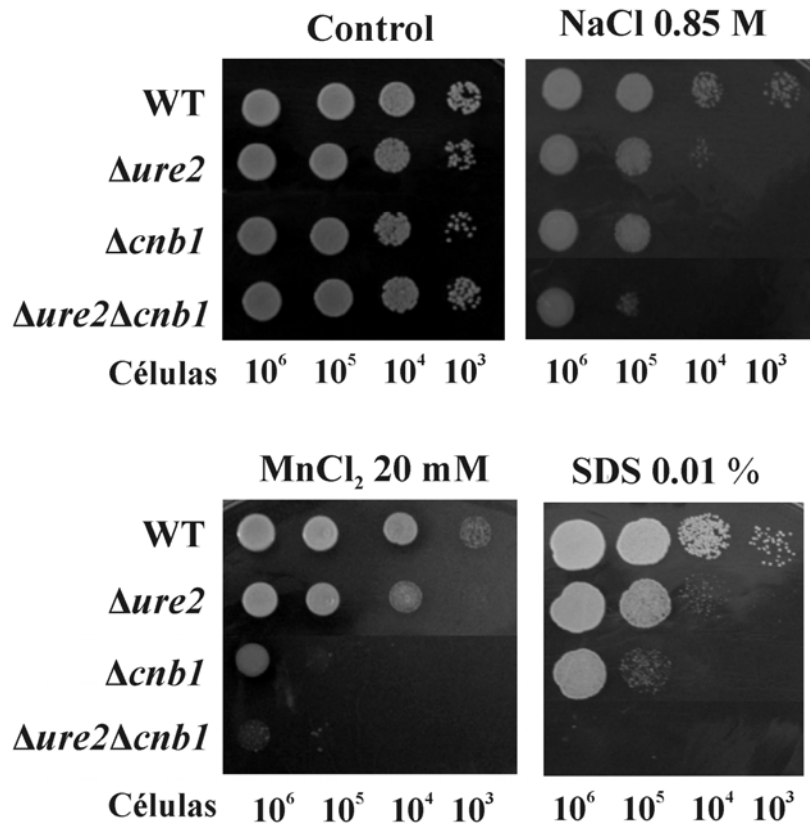
Figura 12. A. Estructura de la subunidad catalítica de la calcineurina. CNB, dominio de unión a calcineurina B; CaM, dominio de unión a calmodulina; AI, dominio autoinhibitorio. B. Alineamiento de las secuencias de las subunidades catalíticas de la calcineurina de *S. cerevisiae* y *H. polymorpha* realizado con el programa clustalW. Las sustituciones conservativas se representan con “.”. Las sustituciones semiconservativas se representan con “.”.



**Figura 13. Alineamiento de las secuencias de la subunidad reguladora de la calcineurina de *S. cerevisiae* y *H. polymorpha* realizado con el programa clustalW.** Se representan los 4 motivos “EF-hands”. Los residuos que participan en la unión del  $Ca^{2+}$  se indican con “#”. Las sustituciones conservativas se representan con “.”. Las sustituciones semiconservativas se representan con “:”.

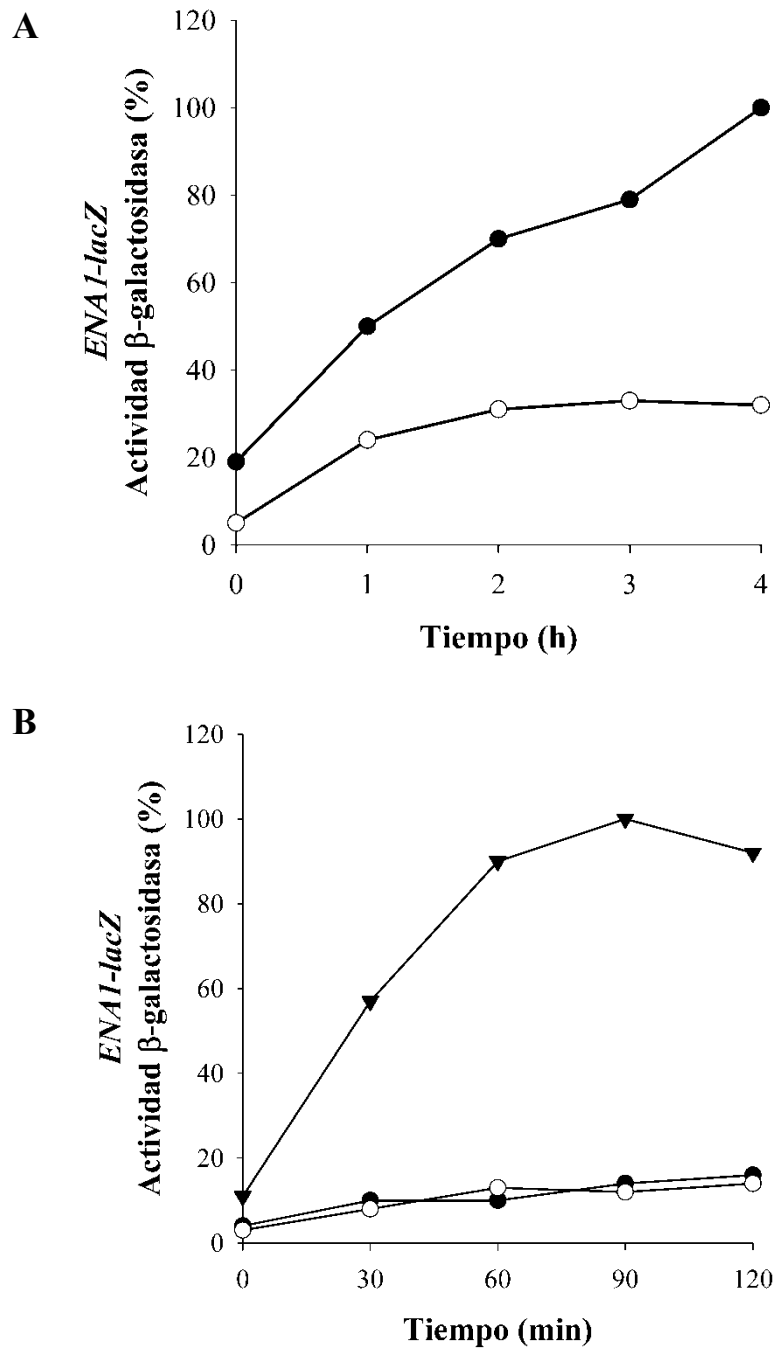
La función de la calcineurina puede verse afectada *in vivo* mediante la mutación de ambas subunidades catalíticas (*cna1cna2*), mediante la mutación del gen *CNB1* (*cnb1*) o, como se ha mencionado anteriormente, con sus inhibidores específicos (FK506, ciclosporina) (Cyert *et al.*, 1991; Cyert y Thorner, 1992; Liu *et al.*, 1991; Kuno *et al.*, 1991). Decidimos interrumpir la subunidad reguladora debido al mayor tamaño del gen que facilitaba la posterior recombinación homóloga tras la introducción del gen marcador. Una vez obtenida la cepa  $\Delta cnb1$ , comparamos su crecimiento con la cepa  $\Delta ure2$  y la cepa silvestre en presencia de  $Na^+$ ,  $Mn^{2+}$  y SDS. Se observó un fuerte paralelismo entre ambas cepas mutantes que mostraron casi el mismo grado de sensibilidad a dichos compuestos. Para intentar dilucidar el tipo de interacción entre la calcineurina y Ure2 se construyó la cepa mutante  $\Delta ure2\Delta cnb1$  que se sometió a los mismos test de crecimiento.  $\Delta ure2 \Delta cnb1$  mostró un fenotipo de sensibilidad próximo al de  $\Delta cnb1$ , aunque ligeramente más sensible (figura 14). Este resultado nos indicaba que la calcineurina se sitúa corriente abajo respecto a Ure2 o, dicho de otra forma, que la calcineurina es epistática respecto a Ure2.





**Figura 14.  $\Delta ure2$  muestra los mismos fenotipos que  $\Delta cnb1$ .** Las cepas WT,  $\Delta ure2$ ,  $\Delta cnb1$  y  $\Delta ure2\Delta cnb1$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris pH 5,5 con NaCl,  $MnCl_2$  o SDS a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Asimismo determinamos los niveles de expresión de *ENAI* en una cepa  $\Delta cnb1$  observando una menor inducción en respuesta a  $Na^+$  en la cepa mutante respecto a la cepa silvestre (figura 15A) Finalmente, analizamos los niveles de *ENAI* en la cepa WT en respuesta a FK506, inhibidor de la calcineurina, y al agente quelante de  $Ca^{2+}$  EGTA. De acuerdo con una activación de *ENAI* dependiente de  $Ca^{2+}$ /calcineurina, ambos compuestos bloquearon la expresión del gen (figura 15B).



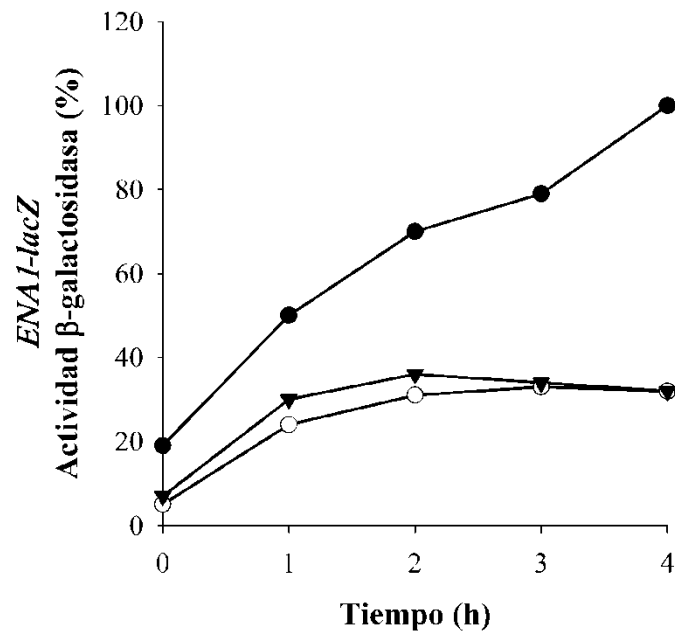
**Figura 15. Efecto de la calcineurina sobre la expresión de *ENAI*.** **A. Efecto de la delección de *CNB1* sobre la expresión de *ENAI*.** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●) y  $\Delta cnb1$  (○) portadoras de la construcción *ENAI-lacZ*. Las células crecidas en amonio se incubaron en el mismo medio con NaCl 0,7 M durante 4 horas. **B. Efecto del FK506 y el EGTA sobre la expresión de *ENAI*.** Expresión de *ENAI* en la cepa WT *ENAI-lacZ*. Las células crecidas en amonio se incubaron en el mismo medio con NaCl 0,7 M durante 4 horas (▼), con EGTA 20 mM (●) o con FK506 25  $\mu$ g/ml (○). Se representan los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Como se mencionó anteriormente la calcineurina regula la expresión génica a través de la activación mediante desfosforilación del factor transcripcional Crz1 (Stathopoulos y Cyert, 1997). La búsqueda en la genoma de *H. polymorpha* de posibles secuencias codificantes de este factor transcripcional dio como resultado la aparición de una proteína que denominamos HpCrz1, con similitud a Crz1 de diversos organismos. Sin embargo, el grado de identidad con ScCrz1 fue bastante bajo al comparar la secuencia completa. La mayor similitud entre las dos proteínas la encontramos en el extremo C-terminal. En este extremo ScCrz1 contiene tres dominios de unión al DNA (tipo “zinc finger”) en su extremo carboxy-terminal (Matheos *et al.*, 1997). Normalmente estos dominios están formados por 20-30 aminoácidos con dos pares de cisteínas o histidinas en ambos extremos involucrados en la unión del átomo de zinc. Se han caracterizado muchas clases de dominios zinc-finger de acuerdo al número y posición de los residuos de histidina y cisteína. Así en la clase C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> el primer par de residuos son cisteínas y el segundo, histidinas. El análisis de la secuencia peptídica de HpCrz1 a través del programa Scan Prosite predijo igualmente la existencia de tres dominios tipo “zinc finger” entre los residuos 450-477, 478-505 y 506-543 (figura 16).



**Figura 16. Alineamiento de los tres motivos “Zinc finger” del factor transcripcional Crz1 de *H. polymorpha* y *S. cerevisiae*.** Los residuos que se unen al DNA se denotan con “^” y los que unen zinc están en negrita. Las sustituciones conservativas se representan con “.”. Las sustituciones semiconservativas se representan con “:”.

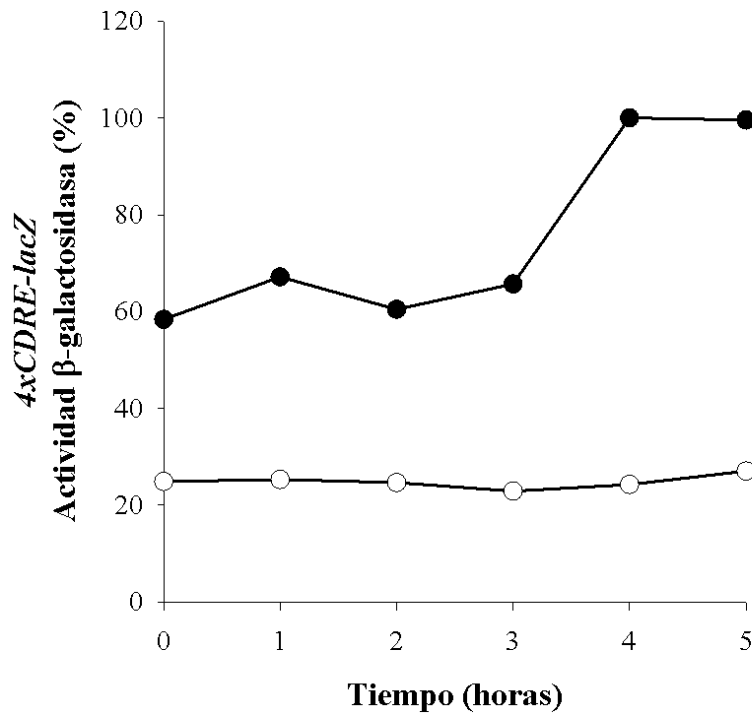
Para determinar que la calcineurina regula la expresión de *ENAI* a través de *Crz1* en *H. polymorpha*, llevamos a cabo la interrupción del gen *HpCRZ1* y medimos los niveles de expresión de *ENAI-lacZ*. El mutante  $\Delta crz1$  mostró niveles de expresión inferiores a la cepa WT y muy similares a los mostrados por  $\Delta cnb1$  (figura 17). Este resultado confirmó la inducción de *ENAI* por parte de *Crz1* y apunta a la existencia de la misma cascada de señalización mediada por la calcineurina en respuesta a estrés salino descrita en *S. cerevisiae*.



**Figura 17. Efecto de la delección de *CNBI* y *CRZI* sobre la expresión de *ENAI*.** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●),  $\Delta cnb1$  (○) y  $\Delta crz1$  (▼) portadoras de la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en el mismo medio con NaCl 0,7 M durante 4 horas. Se representan los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

#### 2.4 La delección de *URE2* reduce la expresión génica dependiente de calcineurina y el contenido celular total de $\text{Ca}^{2+}$ .

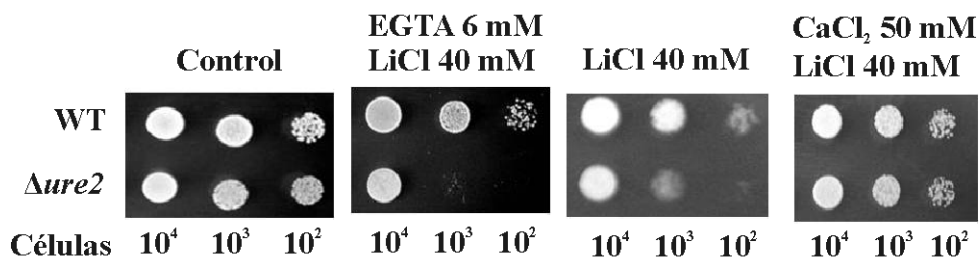
Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que en  $\Delta ure2$  podría existir una menor activación de la calcineurina y como resultado una menor expresión de *ENAI*. El grupo de Martha Cyert definió en 1997 la región génica que media la expresión dependiente de calcineurina mediante la unión al gen reportero *lacZ* de segmentos del gen *FKS2*. Este gen codifica una de las subunidades catalíticas de la  $\beta$ -1,3 glucano sintasa de la pared celular. Los niveles de mRNA de *FKS2* aumentan cuando las células se incuban en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o feromonas, siendo en ambos casos la transcripción dependiente de calcineurina (Mazur *et al.*, 1995). Una región de 24 pb (CACCAGTCGGTGGCTGTGCGCTTG) fue identificada como la responsable de la expresión dependiente de la calcineurina y denominada elemento de respuesta dependiente de calcineurina (Calcineurin-Dependent Element Response: CDRE). El factor transcripcional se une directa y específicamente a esta secuencia (Stathopoulos y Cyert, 1997). Además se observó que la multimerización de la secuencia CDRE era capaz de incrementar la expresión del gen reportero, siendo la construcción que contiene 4 copias en tándem del elemento (*4xCDRE-lacZ*) el de mayor expresión (Stathopoulos y Cyert, 1997). Desde entonces, esta construcción se ha usado como una herramienta de gran utilidad para determinar los valores de expresión dependientes de calcineurina y, por tanto, de su estado de activación. Es por ello, que insertamos la secuencia reportera *4xCDRE-lacZ* (proporcionada por Martha Cyert) en las cepas WT y  $\Delta ure2$  con el fin de determinar la expresión dependiente de calcineurina en ambas cepas.  $\Delta ure2$  mostró ausencia de inducción en respuesta a  $\text{Na}^+$  a diferencia de la cepa silvestre (figura 18). Este resultado sugería que efectivamente la ausencia de Ure2 conlleva una pérdida de activación de la calcineurina. Además, es importante tener en cuenta que incluso a tiempo cero, es decir, en ausencia de estrés salino,  $\Delta ure2$  muestra una menor expresión dependiente de calcineurina. Este hecho sugiere que en  $\Delta ure2$  existe *per se* un defecto en la vía de señalización de la calcineurina, independientemente del estrés salino al que pueda verse sometida la cepa.



**Figura 18. Efecto de la delección de *URE2* sobre la transcripción dependiente de calcineurina.** La transcripción dependiente de calcineurina se determinó midiendo la actividad β-galactosidasa en cepas WT (●) y  $\Delta ure2$  (○) que portan la construcción *4xCDRE-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con NaCl 0.7 M incubándose durante 5 horas. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

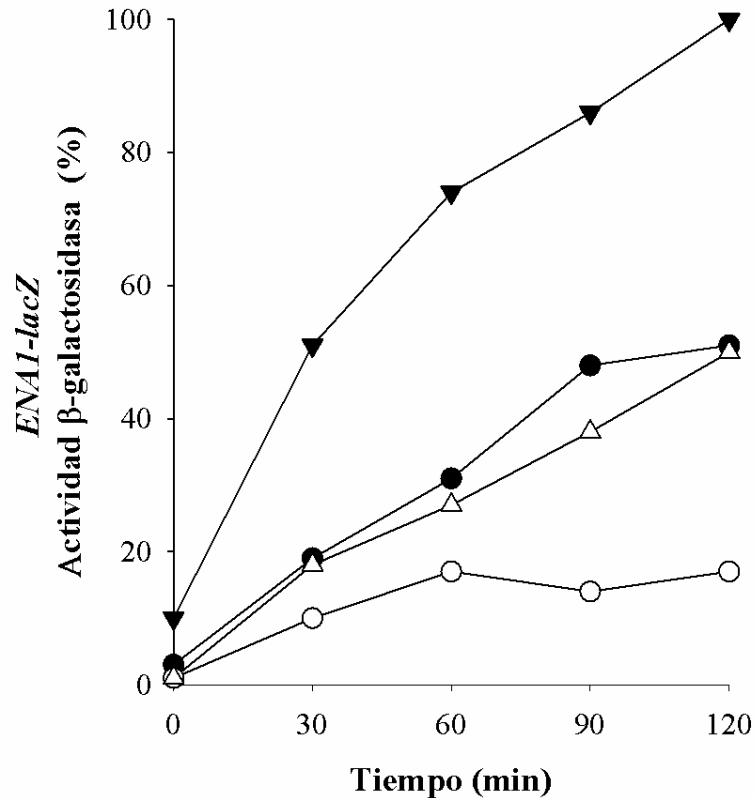
La siguiente pregunta que nos planteamos fue cuál era la causa de la falta de activación de la calcineurina en  $\Delta ure2$ . Se sabe que los cambios en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  participan en gran variedad de procesos fisiológicos. Las características básicas de la señalización por  $Ca^{2+}$  en *S. cerevisiae* son muy similares a los mecanismos existentes en las células de mamíferos, esto es, el  $Ca^{2+}$  actúa como señalizador a través de la activación de la vía de la calmodulina/calcineurina modulando la transcripción de un gran número de genes. Por este motivo, pensamos en la posibilidad de que en  $\Delta ure2$  los niveles citosólicos de calcio estuvieran reducidos. Como primera aproximación para ver si en  $\Delta ure2$  existe una menor concentración de  $Ca^{2+}$  observamos su crecimiento en un medio con exceso de  $Ca^{2+}$  y con concentraciones

mínimas de este compuesto. De ser cierta nuestra hipótesis al incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular forzaríamos su entrada, se incrementaría su concentración citoplasmática, activándose en mayor medida la calcineurina y con ello la expresión de *ENAI*. La presencia de un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  hizo que  $\Delta ure2$  recuperase su tolerancia a  $\text{Li}^+$  alcanzando los niveles de crecimiento del WT. Por el contrario la adición de EGTA, agente que quela el  $\text{Ca}^{2+}$ , produjo un incremento en la sensibilidad de  $\Delta ure2$  en respuesta a  $\text{Li}^+$ , mientras que el crecimiento del WT no se vio alterado (figura 19).



**Figura 19. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y el EGTA en la sensibilidad de  $\Delta ure2$  a  $\text{Li}^+$ .** Las cepas WT y  $\Delta ure2$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGNH con EGTA más LiCl, LiCl, y  $\text{CaCl}_2$  más LiCl a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 días.

Para verificar que los fenotipos observados se debían a cambios en la expresión de *ENAI* medimos la expresión de *ENAI-lacZ* en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y observamos que efectivamente la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  producía un aumento en la expresión del gen *ENAI* en  $\Delta ure2$  (figura 20). Sin embargo, llama la atención que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  produce una mayor inducción de la expresión de *ENAI* en la cepa WT que en la cepa  $\Delta ure2$ . Este hecho indica la existencia de una alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\Delta ure2$  y sugiere que podría existir un defecto en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , y como consecuencia, unos niveles alterados de  $\text{Ca}^{2+}$  respecto a la cepa silvestre.

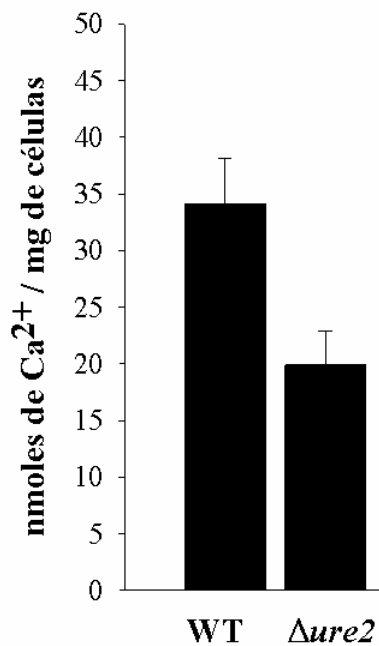


**Figura 20. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la expresión de *ENAI* en las cepas WT y  $\Delta ure2$ .** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT y  $\Delta ure2$  que portan la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio. Se determinó la expresión de *ENAI* en la cepa WT (●) y  $\Delta ure2$  (○) incubadas en NaCl 0.7 M y en la cepa WT (▼) y  $\Delta ure2$  (Δ) incubadas en NaCl 0.7 con  $\text{CaCl}_2$  50 mM durante 120 min. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

En levaduras el contenido total de  $\text{Ca}^{2+}$  es la suma de dos “pools” principales (Cunningham y Fink, 1994). Más de un 90 % del calcio total se encuentra en la vacuola unido de forma relativamente estable al polifosfato y se conoce como pool de  $\text{Ca}^{2+}$  no intercambiable o poco intercambiable (Eilam *et al.*, 1985). El pool intercambiable lo compone el catión divalente localizado en el citosol, el RE y Golgi así como una pequeña fracción del enorme pool vacuolar (Fu *et al.*, 2000; Cunningham y Fink, 1994a; Eilam, 1982 a,b).



La espectrofotometría de absorción atómica con llama es una de las técnicas utilizada comúnmente en levaduras para medir el contenido celular total de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dado los resultados preliminares mencionados, se decidió medir el contenido total de  $\text{Ca}^{2+}$  en el WT y en el  $\Delta ure2$ . Como era de esperar, dada la baja expresión dependiente de calcineurina, el contenido total de  $\text{Ca}^{2+}$  fue menor en  $\Delta ure2$  que en el WT (figura 21).



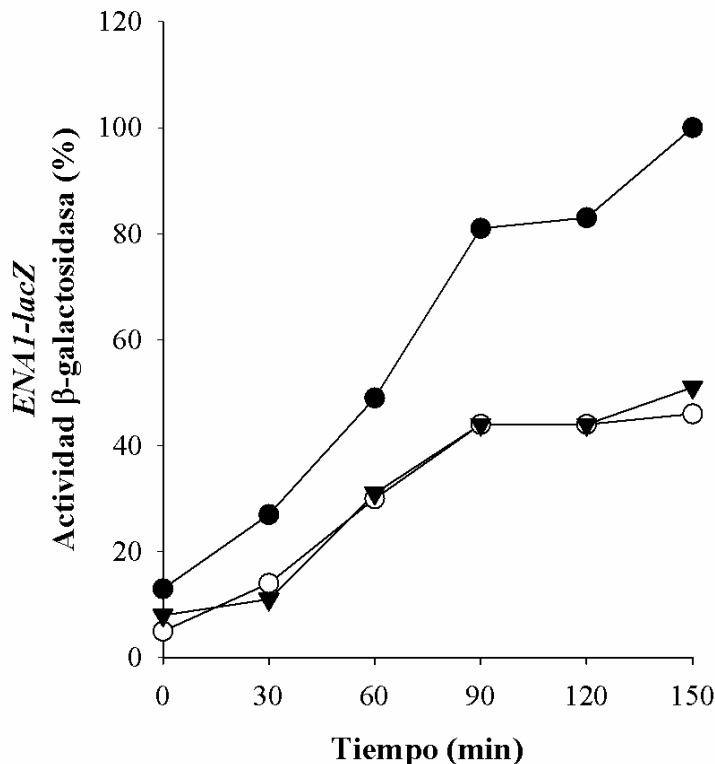
**Figura 21. Contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en las cepas WT y  $\Delta ure2$ .** Las células crecidas en amonio hasta una  $\text{DO}_{660}$  de 0.3 se recogieron mediante filtración y fueron analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica. Los valores representan la media de tres experimentos independientes, en cada uno de los cuales se realizaron 3 réplicas,  $\pm$  desviación estándar.

En conjunto los resultados obtenidos indican que Ure2 participa en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y como consecuencia en la activación de la calcineurina. Además apuntan a la existencia en un defecto en la entrada del catión.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula no sólo depende de su concentración extracelular. Se ha descrito al menos otro mecanismo que describe como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior depende de su concentración en los compartimentos intracelulares. En el apartado 2.6 analizaremos el papel de Ure2 en la regulación de dicho mecanismo.

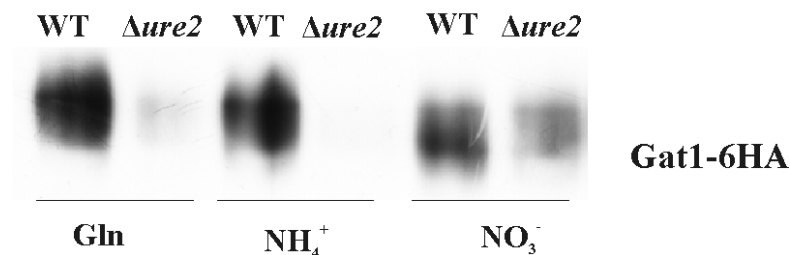
## 2.5 La calcineurina regula los niveles de Gat1

Como se expuso con anterioridad en *S. cerevisiae* la expresión de *ENAI* es positivamente regulada por los factores GATA, Gat1 y Gln3 (Crespo *et al.*, 2001). Nuestro grupo ha identificado y caracterizado a HpGat1 como un factor GATA positivo que participa en la regulación de los genes de asimilación de nitrato. Sin embargo, HpGln3 no parece afectar significativamente a los sistemas de asimilación de nitrato. Resultados previos obtenidos en el laboratorio mostraron que la cepa  $\Delta gat1$  es sensible a  $Li^+$  y  $Na^+$  (tesis B. Medina) por lo que a priori parecía el factor GATA responsable de la inducción de *ENAI*. Así, de acuerdo con lo descrito en *S. cerevisiae*, en un  $\Delta ure2$ , Gat1 entraría en el núcleo, activando la expresión de *ENAI*. Para comprobar que efectivamente HpGat1 induce la expresión de *ENAI* en *H. polymorpha*, determinamos la expresión de *ENAI-lacZ* en la cepa  $\Delta gat1$  observando menores niveles de expresión (figura 22). Los niveles de expresión de *ENAI* fueron idénticos a los presentados por  $\Delta ure2$ .



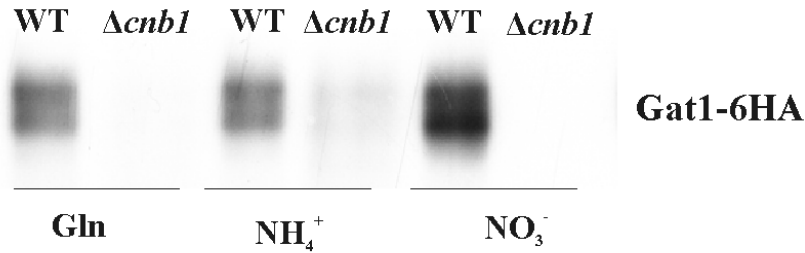
**Figura 22.** La cepa  $\Delta gat1$  presenta bajos niveles de expresión de *ENAI*. La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●),  $\Delta ure2$  (○) y  $\Delta gat1$  (▼) que portan la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con NaCl 0.7 M incubándose durante 150 min. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Aún en ausencia de Gat1 se observa inducción de la expresión de *ENAI*, lo que sugiere que la vía de señalización que integra a Gat1 no es la única vía responsable de la regulación de *ENAI* en respuesta a estrés salino. Dados los datos obtenidos decidimos estudiar los niveles de Gat1 en  $\Delta ure2$  en respuesta a distintas fuentes nitrogenadas. Para ello, Gat1 fue etiquetado en su extremo carboxi-terminal con seis copias de la proteína HA del virus influenza humano y detectado mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-HA. En *S. cerevisiae* se ha descrito que mientras *GLN3* se expresa de forma constitutiva la expresión de *GAT1* es sensible a NCR estando regulada por los 4 factores GATA en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno (Georis *et al.*, 2009). Sin embargo, la delección de *Ure2* no tiene efectos significativos sobre los niveles de mRNA de *GAT1* ni en fuentes preferidas de nitrógeno como la asparagina ni en fuentes pobres como la prolina (Coffman *et al.*, 1996). Sorprendentemente, a diferencia de lo descrito en *S. cerevisiae*, los niveles de Gat1 fueron muy inferiores en  $\Delta ure2$  respecto al WT tanto en presencia de fuentes preferidas como la glutamina o el amonio como no preferidas como el nitrato (figura 23).



**Figura 23. La delección de *URE2* disminuye los niveles de Gat1.** Los niveles de Gat1-6HA se analizaron mediante SDS-PAGE en las cepas WT y  $\Delta ure2$ . Las células crecidas en amonio hasta la fase exponencial, se lavaron e incubaron durante 2 h en glutamina 5 mM, amonio 5 mM o nitrato 5 mM. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína.

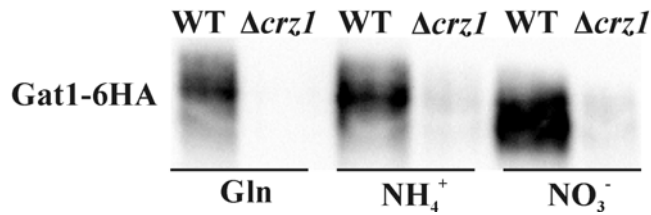
La estrecha correlación entre  $\Delta ure2$  y  $\Delta cnb1$  nos llevó a preguntarnos si los niveles de Gat1 podrían depender de la calcineurina en *H. polymorpha*.  $\Delta cnb1$  mostró incluso menores niveles de Gat1 que  $\Delta ure2$  (figura 24).



**Figura 24. La delección de *CNBI* disminuye los niveles de Gat1.** Los niveles de Gat1-6HA se analizaron mediante SDS-PAGE en las cepas WT y  $\Delta cnb1$ . Las células crecidas en amonio hasta la fase exponencial, se lavaron e incubaron durante 2 h en glutamina 5 mM, amonio 5 mM o nitrato 5 mM. Se analizaron 10  $\mu$ g de proteína de la cepa WT y 40  $\mu$ g de  $\Delta cnb1$ .

Este resultado supone la primera vez que se describe la relación de un factor transcripcional GATA con la calcineurina en levaduras si bien en mamíferos se ha descrito ampliamente dicha asociación. Así por ejemplo, la calcineurina induce la expresión del factor transcripcional GATA-2 que junto con NFATc1 juega un papel importante en la regeneración y la hipertrofia del músculo (Musaro *et al.*, 1999; Sakuma *et al.*, 2003). Otro ejemplo es la regulación negativa de la unión del factor GATA-6 producido por el bloqueo de la calcineurina en células diferenciadas del músculo liso vascular (Wada *et al.*, 2002). Por otra parte, se han descrito efectos hipertróficos de la calcineurina en cardiomiocitos ligados con su interacción con el factor transcripcional GATA-4 (Wilkins y Molkenin, 2002).

Con el fin de dilucidar si la regulación de Gat1 por parte de la calcineurina era transcripcional o postraducciona, analizamos los niveles del factor en la cepa  $\Delta crz1$ . Como muestra la figura 25,  $\Delta crz1$  mostró igualmente niveles muy bajos de Gat1, casi indetectables mediante western-blot. Este resultado apunta a la regulación de la expresión de Gat1 por parte de la calcineurina a través de Crz1.



**Figura 25. La delección de *CRZ1* disminuye los niveles de *Gat1*.** Los niveles de Gat1-6HA se analizaron mediante SDS-PAGE en las cepas WT y  $\Delta crz1$ . Las células crecidas en amonio hasta la fase exponencial, se lavaron e incubaron durante 2 h en glutamina 5 mM, amonio 5 mM o nitrato 5 mM. Se cargaron 10  $\mu$ g de proteína.

Puesto que la expresión génica dependiente de calcineurina depende de la unión de Crz1 a las secuencias CDRE presentes en los promotores de los genes, analizamos la región 5' no codificante de *Gat1* en busca de dicha secuencia mediante el uso del programa "Regulatory Sequence Analysis Tools" (RSAT) ([rsat.ulb.ac.be/rsat](http://rsat.ulb.ac.be/rsat)). Analizamos las dos cadenas de la secuencia promotora (800 pb) en busca de CDREs usando la matriz de alineamiento basada en la secuencia cwmmGCCmC generada por el programa Jaspar (<http://jaspar.cgb.ki.se/>). El análisis bioinformático reveló la existencia de 4 secuencias putativas CDRE. De ellas las secuencias situadas a -765/-757 y 589/-581 presentaron una mayor probabilidad (figura 26). La realización de mutagénesis dirigida sobre cada una de estas secuencias y la fusión de las versiones truncadas del promotor al gen reportero *lacZ* permitiría conocer cuál o cuales son las secuencias responsables de la unión del factor en base a la inducción de la expresión del *GAT1*, en respuesta a estrés salino.

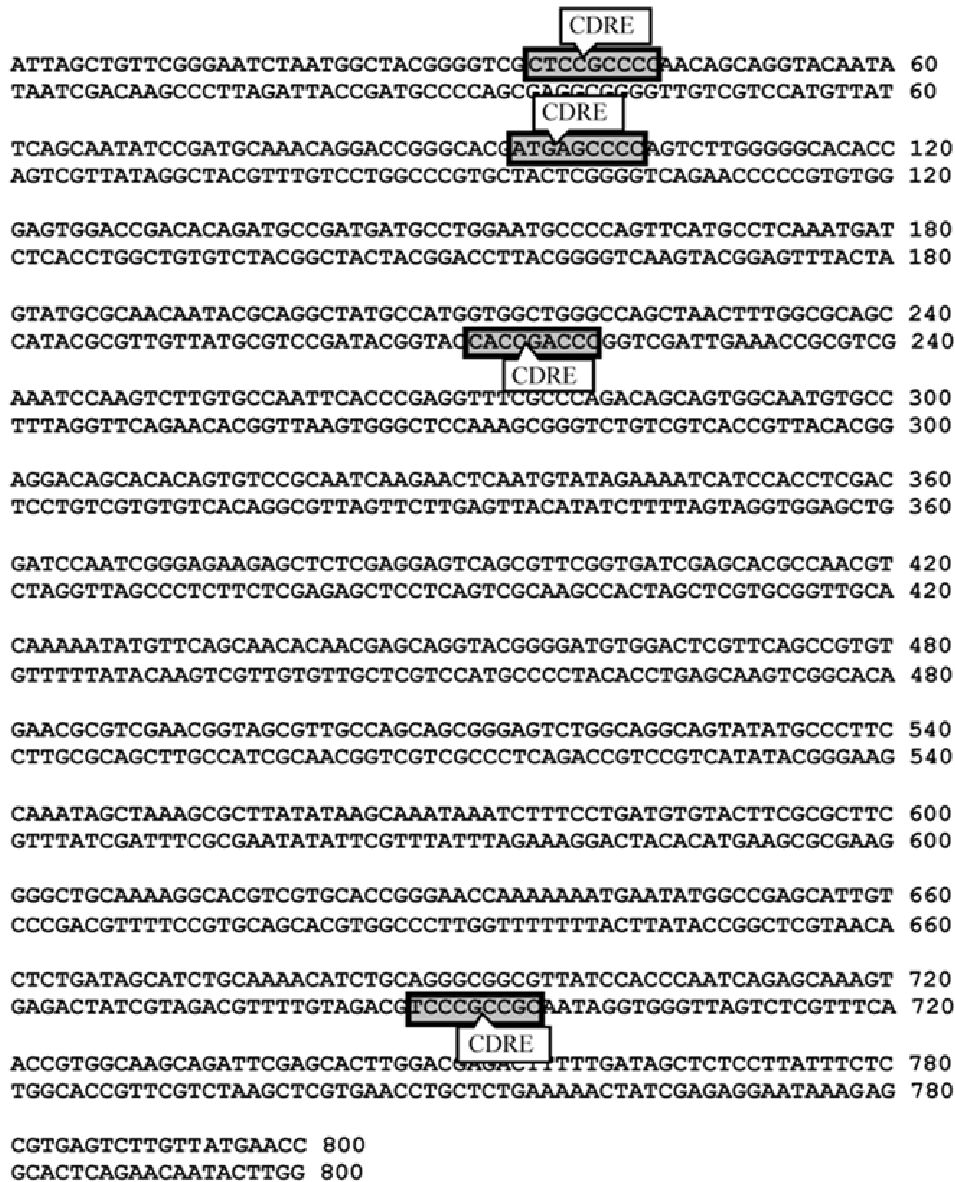
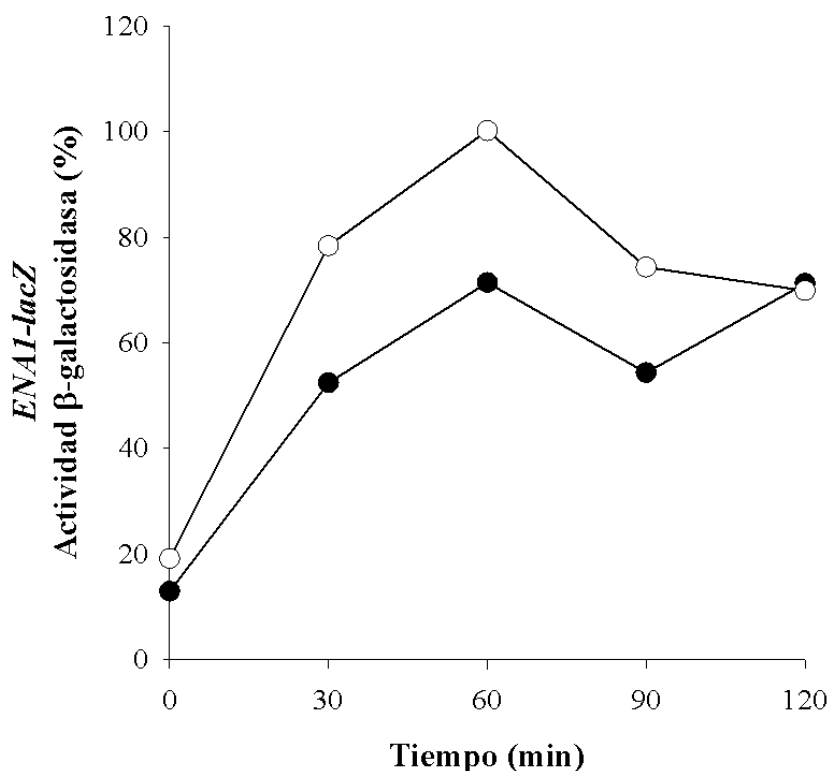


Figura 26. Secuencias CDRE y GATA identificadas en el promotor de *GATI* mediante análisis bioinformático con el programa RSAT. Se representan los 800 nucleótidos de la región 5' no codificante del gen *GATI* situados antes del codón de inicio.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, pudimos concluir por tanto que los bajos niveles de Gat1 presentes en  $\Delta ure2$  se deben a la débil activación de la calcineurina. Sin embargo, aún teníamos que esclarecer si la calcineurina actuaba sobre *ENAI* exclusivamente vía Gat1, o existía una vía independiente de Gat1. Para diferenciar ambas posibilidades medimos los niveles de expresión de *ENAI-lacZ* en  $\Delta gat1$  en ausencia y presencia de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , observándose un incremento en la expresión en respuesta a  $Ca^{2+}$  (figura 27). Este resultado indica que la expresión de *ENAI* se encuentra bajo el control dual de la calcineurina-Crz1-Gat1 y calcineurina-Crz1 y da cuenta de la inducción de la expresión de *ENAI* existente en  $\Delta gat1$ .

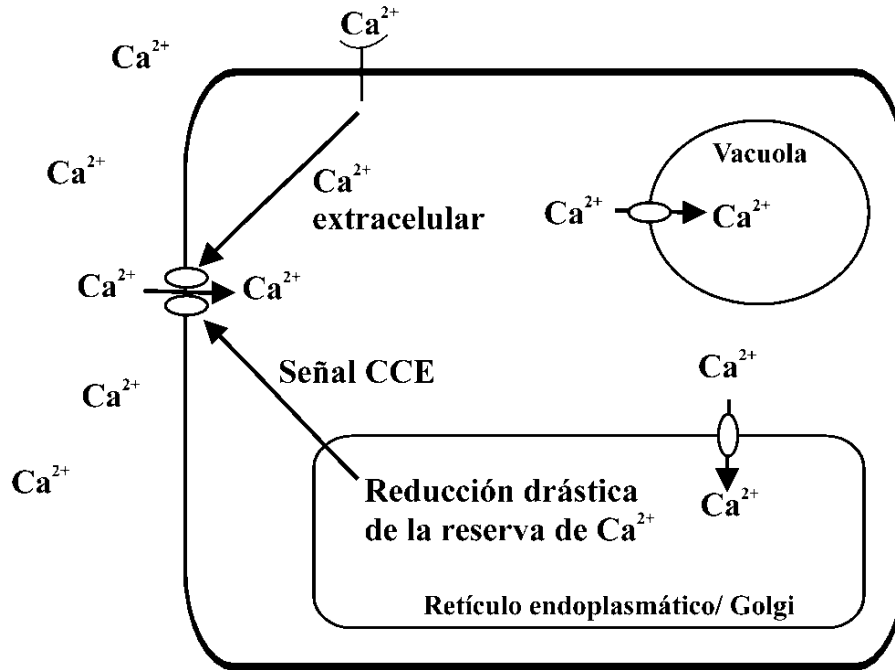


**Figura 27. Efecto del  $Ca^{2+}$  en la expresión de *ENAI* en  $\Delta gat1$ .** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en una cepa  $\Delta gat1$  que porta la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio. Se determinó la expresión de *ENAI* en  $\Delta gat1$  (●) incubadas en NaCl 0.7 M y en NaCl 0.7 con  $CaCl_2$  50 mM (○) durante 120 min. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

## 2.6 Ure2 regula la expresión de *PMR1* a través de *Gat2*

Los resultados expuestos en el apartado 2.4 pusieron de manifiesto la participación de Ure2 en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , más concretamente en la entrada del mismo. Uno de los mecanismos que regula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula depende del nivel del catión en el medio extracelular. El segundo mecanismo, cuantitativamente más importante, se conoce como señal CCE (*capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) (figura 28). En mamíferos el  $\text{Ca}^{2+}$  libre localizado en el RE actúa como un pool móvil que puede ser liberado al citosol en respuesta a diferentes estímulos. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico resultante, puede entonces activar vías de señalización que alteran la expresión de muchos genes (Putney, 1992). En muchas células la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE puede inducir, como consecuencia de la reducción en el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado, una señal que provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática. En *S. cerevisiae*, existen evidencias de la existencia de un mecanismo similar al que opera en mamíferos. Así, en un mutante  $\Delta pmr1$ , que presenta una reducción drástica en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en RE-Golgi, se produce un incremento en la entrada desde el exterior (Antebi y Fink 1992; Halachmi y Eilman, 1996; Rudolph *et al.*, 1989; Sorin *et al.*, 1997). Por tanto, la reducción en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en RE-Golgi estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en levaduras de manera análoga a la señal CCE en mamíferos (Csutora *et al.*, 1999; Durr *et al.*, 1998; Locke *et al.*, 2000). Estas evidencias nos hicieron pensar que el menor contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\Delta ure2$  podría deberse a una mayor acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en uno o varios compartimentos celulares. Las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas responsables de la reducción drástica de los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  son Pmc1 y Pmr1. La primera se encuentra en la membrana vacuolar mientras que la segunda se sitúa en Golgi. Con el fin de determinar la causa del bajo contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\Delta ure2$  se decidió identificar sendos genes ortólogos en *H. polymorpha* con el fin medir la expresión de ambos genes mediante la fusión de sus promotores al gen reportero *lacZ*.





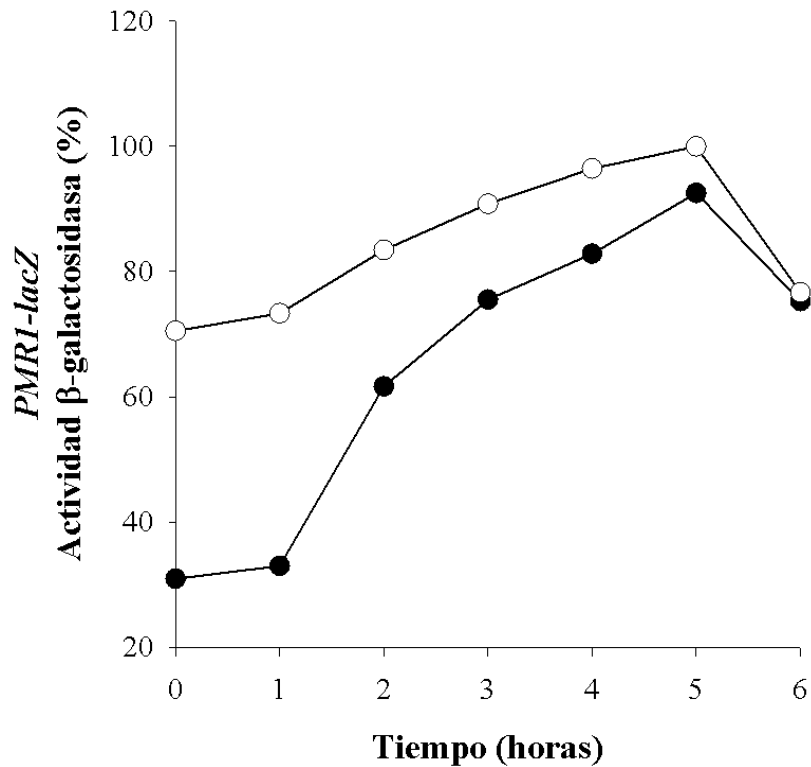
**Figura 28. Modelo que representa como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en levaduras está regulada de forma coordinada por dos mecanismos diferentes.** El primer mecanismo es la respuesta CCE que acopla la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al contenido en Golgi-retículo endoplasmático. El segundo mecanismo acopla la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (extraído de Kellermayer, 2003).

La búsqueda en el genoma de *H. polymorpha* de pautas abiertas de lectura con alta similitud a la secuencia de *ScPMR1* y *ScPMC1* nos permitió identificar dos proteínas semejantes a las dos ATPasas, que denominamos HpPmr1 y HpPmc1. Estas proteínas guardan un 60% y un 51% de identidad con sus ortólogos de *S. cerevisiae* y presentan igualmente la secuencia firma de las ATPasas de tipo P (figura 29).

<b>ScPmc1</b>	ATAVCS <b>DKT</b> GTLTENVMTV
<b>HpPmc1</b>	ATAICSD <b>DKT</b> GTLTENRMRV
<b>HpPmr1</b>	VNVICSD <b>DKT</b> GTLTQNHMTV
<b>ScPmr1</b>	VNVICSD <b>DKT</b> GTLTSNHMTV

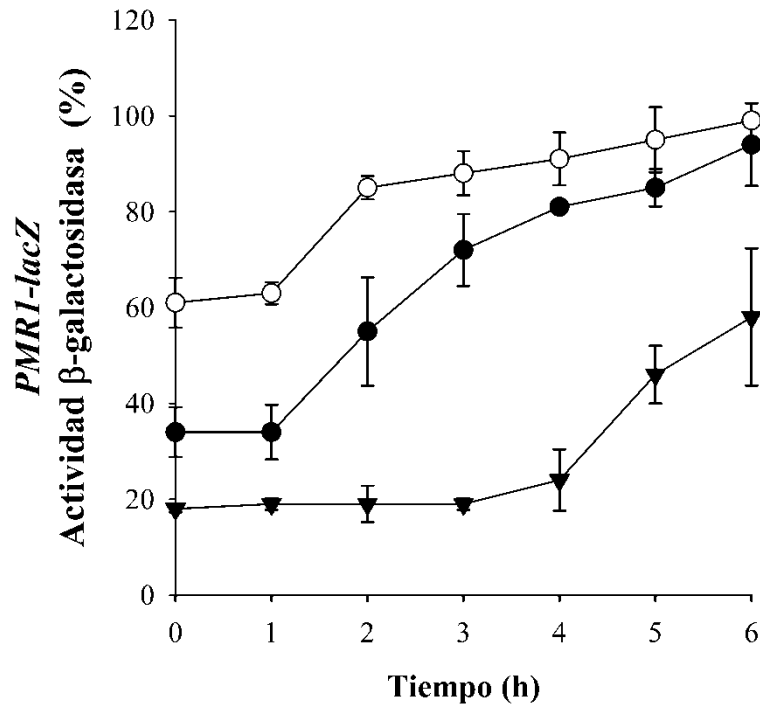
**Figura 29. Alineamiento del dominio de fosforilación de las ATPasas de tipo P, Pmr1 y Pmc1 de *H. polymorpha* y *S. cerevisiae*.**

El análisis de la expresión de *PMRI-lacZ* reveló que  $\Delta ure2$  presentaba niveles de expresión de *PMRI* superiores al WT aún en ausencia de  $Ca^{2+}$  (figura 30, tiempo 0), cuya adición produjo una mayor inducción en la cepa silvestre. La expresión de *PMCI* sin embargo no se vio alterada.



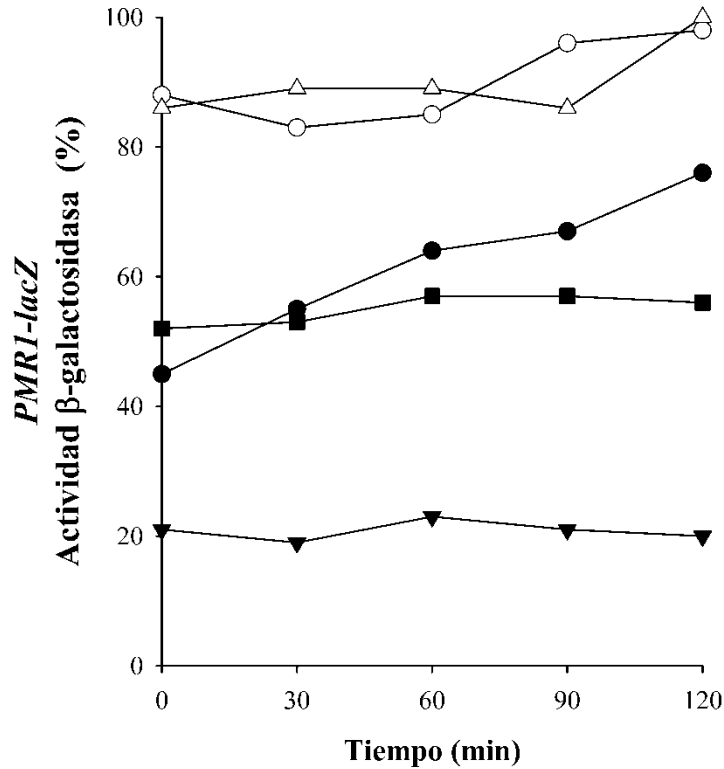
**Figura 30. Efecto de la delección de *URE2* en la expresión de *PMRI*.** La expresión de *PMRI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●) y  $\Delta ure2$  (○) que portan la construcción *PMRI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con  $CaCl_2$  5 mM incubándose durante 6 horas. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Los resultados obtenidos sugerían que los bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  observados en  $\Delta ure2$  se deben a la elevada expresión constitutiva de *PMRI*, que produciría un incremento en el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  en RE-Golgi y como consecuencia la entrada en el interior de la célula disminuiría y con ello el contenido total. Puesto que  $\Delta ure2$  presenta una baja activación de la calcineurina, ésta no podía ser la responsable de los elevados niveles de expresión de *PMRI* en  $\Delta ure2$ . Por tanto, existiría un mecanismo alternativo de regulación de *PMRI*. Puesto que *Ure2*, hasta donde se conoce, regula la expresión génica a través de los factores transcripcionales GATA, lo más probable es que uno o varios de estos factores activasen la expresión de *PMRI*. Inicialmente, descartamos a *Gat1* dado los bajísimos niveles detectados en  $\Delta ure2$ . Como se mencionó en la introducción, nuestro grupo además de *Gat1* ha identificado otros dos factores GATA positivos, *HpGln3* y *HpGat2*. Para estudiar la posible regulación transcripcional de *PMRI* por parte de estos dos factores transcripcionales se construyeron cepas mutantes  $\Delta gat2$  y  $\Delta gln3$  portadoras de la construcción *PMRI-lacZ*. El análisis de la expresión de *PMRI-lacZ* en estas cepas reveló bajos niveles de expresión de *PMRI* en  $\Delta gat2$  (figura 34) mientras que la expresión en  $\Delta gln3$  no se vio alterada. Al analizar en detalle la expresión se observa que  $\Delta gat2$  presenta bajos niveles de expresión de *PMRI*, tanto en ausencia (tiempo 0) como en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extra. Por tanto, en ausencia del factor transcripcional existe una baja expresión constitutiva de *PMRI* que además sólo es capaz de inducirse por  $\text{Ca}^{2+}$  a tiempos muy largos (a partir de 4 horas) presumiblemente a través de la activación de otras vías secundarias de regulación.



**Figura 31. Efecto de la delección de *URE2* y *GAT2* en la expresión de *PMRI*.** La expresión de *PMRI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●),  $\Delta ure2$  (○) y  $\Delta gat2$  (▼) que portan la construcción *PMRI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con  $\text{CaCl}_2$  5 mM incubándose durante 6 horas. Los valores representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

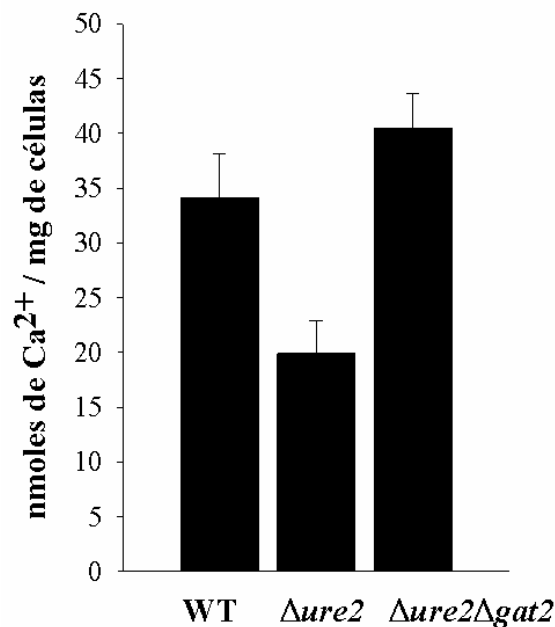
Este resultado sugería que *Gat2* activa la expresión de *PMRI*. De ser cierta nuestra hipótesis una cepa con múltiples copias de *GAT2* (*nGAT2*) debía presentar niveles de expresión de *PMRI* superiores a la cepa silvestre. Para realizar las medidas se construyó una cepa *nGAT2* y se introdujo el reportero *PMRI-lacZ*. Las cepas *nGAT2* se seleccionaron por su mayor sensibilidad a sales. Efectivamente, la sobreexpresión de *GAT2* incrementó la inducción de *PMRI*. Esta cepa presentó niveles de expresión de *PMRI* superiores al WT y similares a los observados en  $\Delta ure2$ . Por último, decidimos interrumpir el gen *GAT2* en un mutante  $\Delta ure2$ , en espera de observar un descenso en los niveles de expresión de *PMRI*. La delección de *GAT2* en una cepa  $\Delta ure2$  devolvió los niveles de expresión de *PMRI* a los observados en la cepa WT (figura 32).



**Figura 32. Expresión de *PMRI* en las cepas *nGAT2* y  $\Delta ure2 gat2$ .** La expresión de *PMRI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●),  $\Delta ure2$  (○)  $\Delta gat2$  (▼), *nGAT2* (Δ) y  $\Delta ure2 gat2$  (■) que portan la construcción *PMRI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con  $CaCl_2$  5 mM incubándose durante 6 horas. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Las cinéticas de inducción muestran que únicamente la cepa WT ve incrementados de forma significativa los niveles de expresión de *PMRI* en presencia de  $Ca^{2+}$  con respecto al tiempo cero. Esto indica que independientemente de la concentración externa de  $Ca^{2+}$ , las demás cepas presentan una expresión constitutiva del gen, elevada en el caso de  $\Delta ure2$  y *nGAT2* y baja en el caso de  $\Delta gat2$ . El hecho de que la delección de *GAT2* en  $\Delta ure2$  devuelva los niveles de expresión a los presentes en la cepa silvestre pero no a los existentes en la cepa  $\Delta gat2$  sugiere que Gat1 podría participar también en la regulación transcripcional de *PMRI*. De esta forma en  $\Delta ure2 \Delta gat2$  la ausencia de Ure2 propiciaría la entrada en el núcleo de Gat1 que podría así activar la expresión de *PMRI*. En  $\Delta gat2$ , sin embargo, Ure2 impediría la entrada de Gat1 al núcleo, impidiendo la inducción de *PMRI* dependiente de Gat1.

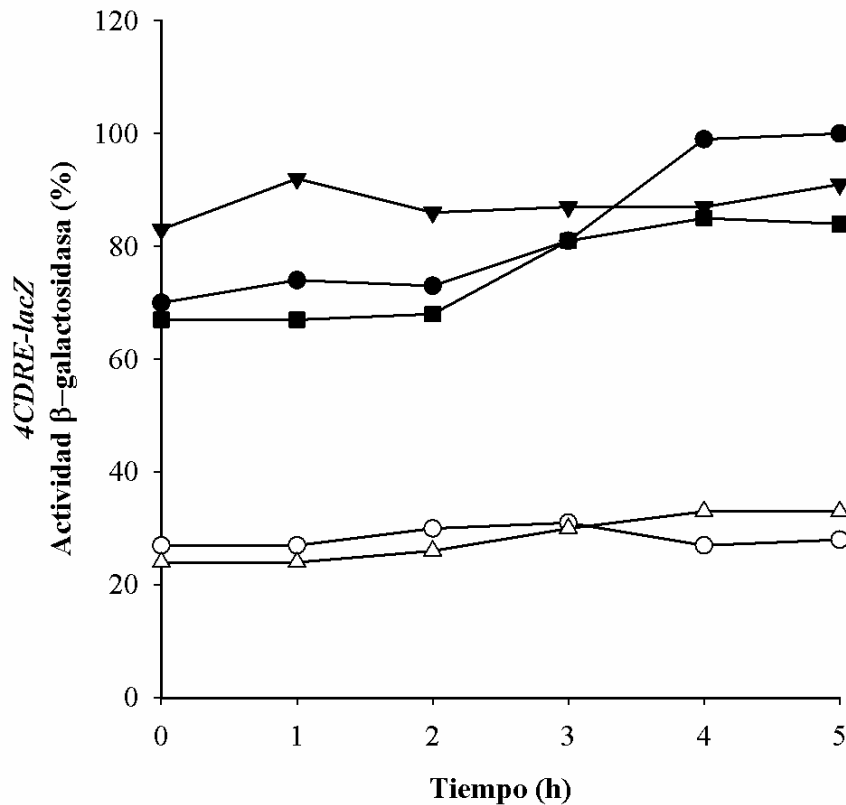
Con el fin de verificar que tal como ocurre en *S. cerevisiae* la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  depende del contenido en el retículo endoplasmático-Golgi, decidimos medir el cambio en el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que se produciría como consecuencia de la delección del gen *GAT2* en una cepa  $\Delta ure2$ . Los menores niveles de expresión debían reflejarse en una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior y en un mayor contenido total. Al comparar el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de las cepas WT,  $\Delta ure2$  y  $\Delta ure2\Delta gat2$  se observó que la interrupción de  $\Delta gat2$  en una cepa  $\Delta ure2$  devolvió los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  total a valores muy similares a los existentes en la cepa WT (figura 33).



**Figura 33. Contenido total de  $\text{Ca}^{2+}$  en las cepas WT,  $\Delta ure2$  y  $\Delta ure2\Delta gat2$ .** Las células crecidas en amonio hasta una DO de 0.3 se recogieron mediante filtración y fueron analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica. Los valores representan la media de tres experimentos independientes, en cada uno de los cuales se realizaron 3 réplicas,  $\pm$  desviación estándar.

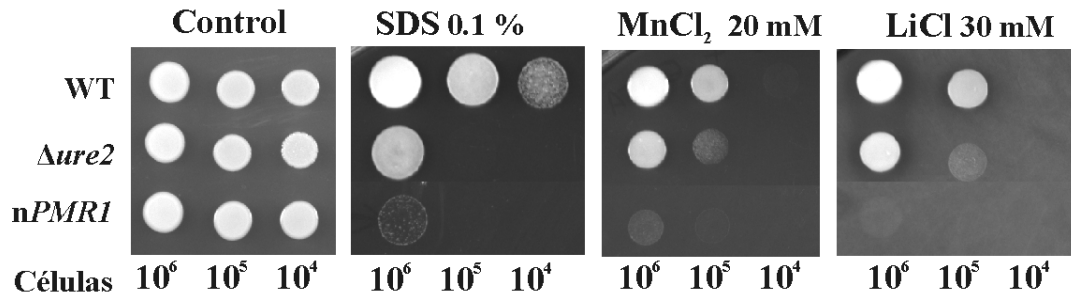
Por tanto podíamos concluir que la expresión de *PMRI* regula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. Dicha entrada determinaría el contenido citosólico del catión y como consecuencia el estado de activación de la calcineurina. Con el fin de contrastar nuestra hipótesis medimos la expresión dependiente de calcineurina en las

cepas  $\Delta gat2$ ,  $\Delta ure2gat2$  y  $nGAT2$ . En  $nGAT2$ , cepa con una expresión elevada de  $PMR1$ , y presumiblemente con una baja entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular, los niveles de  $4xCDRE-lacZ$  fueron muy bajos y similares a los observados en  $\Delta ure2$ . En  $\Delta gat2$ , cepa con una expresión baja de  $PMR1$ , y presumiblemente con una entrada elevada de  $Ca^{2+}$ , los niveles de  $4xCDRE-lacZ$  fueron superiores al WT. La delección de  $GAT2$  en una cepa  $\Delta ure2$  devolvió los niveles de expresión dependientes de calcineurina a los observados en la cepa WT (figura 34).



**Figura 34. Efecto de la delección de *URE2* sobre la transcripción dependiente de calcineurina.** La transcripción dependiente de calcineurina se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●),  $\Delta ure2$  (○),  $\Delta gat2$  (▼),  $nGAT2$  (Δ) y  $\Delta ure2gat2$  (■) que portan la construcción  $4xCDRE-lacZ$ . Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con NaCl 0.7 M incubándose durante 5 horas. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Como hemos visto, los bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos de  $\Delta ure2$  son los responsables de la baja activación de la calcineurina y, por tanto, de los fenotipos asociados a la baja transcripción de los genes regulados por la calcineurina como sensibilidad a  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  o SDS. Tal y como se ha mostrado la sobreexpresión de *PMRI* produce una disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior reduciéndose el contenido celular de éste. Por ello, una cepa con múltiples copias del gen *PMRI* debía presentar los fenotipos asociados a  $\Delta ure2$ . Para verificarlo, se construyó la cepa *nPMRI* y se comparó su crecimiento en placa con la cepa silvestre y la cepa  $\Delta ure2$ . La cepa *nPMRI* fue altamente sensible a SDS,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Li}^+$  (figura 35), incluso más que la cepa mutante.



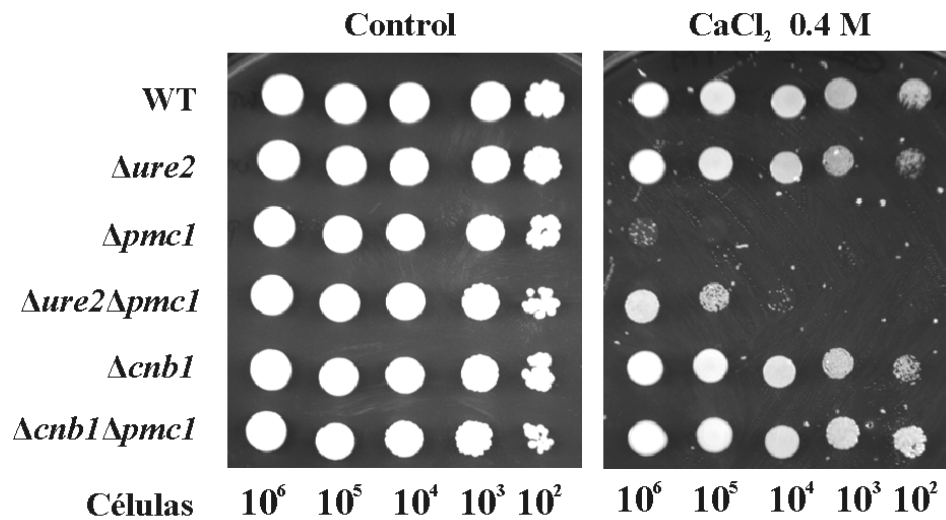
**Figura 35. La sobreexpresión de *PMRI* reproduce los fenotipos de  $\Delta ure2$ .** Las cepas WT,  $\Delta ure2$  y *nPMRI* se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris pH 5,5 con SDS,  $\text{MnCl}_2$  o LiCl a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Este resultado confirmó que los fenotipos observados en  $\Delta ure2$  se deben a la elevada expresión de *PMRI*. La mayor sensibilidad de la cepa *nPMRI* podría deberse al alto número de copias del gen integradas en el genoma de esta cepa, es decir, a una mayor expresión del gen *PMRI* respecto a  $\Delta ure2$ .

En *S. cerevisiae*, la calcineurina además de regular la expresión de *Pmr1* y *Pmc1*, regula postraduccionalmente el antiporte vacuolar de  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  *Vcx1*, inhibiéndolo. *Vcx1* presenta un papel secundario en cepas en que la calcineurina es funcional mientras que confiere un alto grado de tolerancia a  $\text{Ca}^{2+}$  cuando la calcineurina es inactivada. Se ha descrito que la calcineurina disminuye la tolerancia a  $\text{Ca}^{2+}$  de los mutantes  $\Delta pmc1$  inhibiendo la función de *Vcx1* (Cunningham y Fink 1994b; Pittman *et al.*, 2004). Así los mutantes  $\Delta pmc1$  son sensibles a altas concentraciones de



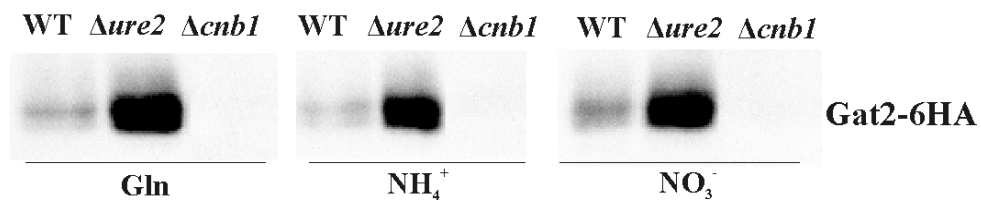
Ca<sup>2+</sup> y esta sensibilidad se revierte mediante la delección de la subunidad reguladora de la calcineurina o bien de las dos subunidades catalíticas. Para estudiar el estado de activación de Vcx1 en  $\Delta ure2$ , asumiendo que tal como ocurre en *S. cerevisiae* su regulación es postraduccional, construimos una serie de cepas con el fin de reproducir lo observado en *S. cerevisiae*. Se construyó una cepa carente de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa vacuolar Pmc1 ( $\Delta pmc1$ ), y dos dobles mutantes carentes además de la subunidad reguladora de la calcineurina ( $\Delta cnb1 \Delta pmc1$ ) o de Ure2 ( $\Delta ure2 \Delta pmc1$ ). Una vez en disposición de los mutantes analizamos su sensibilidad a Ca<sup>2+</sup>. El mutante  $\Delta pmc1$  es muy sensible a Ca<sup>2+</sup>, mientras que  $\Delta ure2 \Delta pmc1$  y  $\Delta cnb1 \Delta pmc1$  son más resistentes. Además, la cepa  $\Delta cnb1 \Delta pmc1$  presenta mayor tolerancia a Ca<sup>2+</sup> que  $\Delta ure2 \Delta pmc1$ , lo que está de acuerdo con el cierto grado de activación de la calcineurina que conserva  $\Delta ure2$  (figura 36). Este resultado corrobora una vez más la baja activación de la calcineurina en  $\Delta ure2$ .



**Figura 36. La delección de URE2 causa la activación de Vcx1.** Las cepas WT,  $\Delta ure2$ ,  $\Delta pmc1$ ,  $\Delta ure2 pmc1$ ,  $\Delta cnb1$  y  $\Delta cnb1 pmc1$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGNH tamponado con succínico-Tris pH 5,5 con CaCl<sub>2</sub> 0.4 M. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

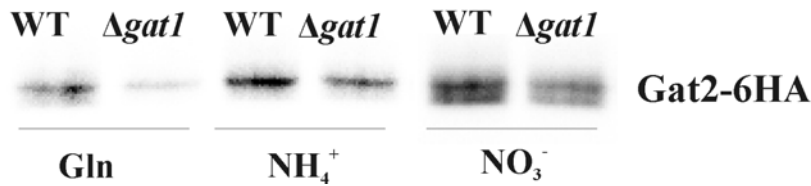
## 2.7 Los niveles de Gat2 están regulados por la calcineurina y por Gat1.

Puesto que Gat2 juega un papel clave corriente abajo de Ure2 al igual que la calcineurina, que a su vez controla los niveles de Gat1, nos preguntamos si los niveles de Gat2 podrían estar controlados también por la calcineurina. Es por ello que determinamos los niveles de Gat2 en  $\Delta cnb1$  y en  $\Delta ure2$ .  $\Delta cnb1$  mostró niveles de proteína casi indetectables mientras que en  $\Delta ure2$  los niveles de Gat2 fueron superiores a los presentes en la cepa WT (figura 37).



**Figura 37. La delección de *CNB1* disminuye los niveles de Gat2-6HA mientras que la delección de *URE2* los aumenta.** Los niveles de Gat2-HA en las cepas WT,  $\Delta ure2$  y  $\Delta cnb1$  se analizaron mediante SDS-PAGE. Las células crecidas en amonio se lavaron y resuspendieron en glutamina 5 mM, amonio 5 mM o nitrato 5 mM. Se analizaron 50  $\mu$ g de proteína de cada cepa.

Los elevados niveles de Gat2 en un  $\Delta ure2$  eran consistentes con la elevada expresión de *PMR1* observada en esta cepa. Sin embargo, dicho resultado parecía contradecir el hecho de la regulación positiva de Gat2 por parte de la calcineurina, menos activa en  $\Delta ure2$ , por lo que se esperaría una expresión muy baja de Gat2 también en esta cepa. Esta aparente contradicción nos hizo pensar en la posibilidad de que la regulación de Gat2 por parte de la calcineurina pudiese ser indirecta. La regulación positiva de Gat2 por parte de Gat1 podría explicar ambos resultados. Así, en ausencia de Ure2, Gat1 estaría en el núcleo activando la expresión de Gat2. En una cepa WT, aunque presenta mayores niveles de Gat1 que  $\Delta ure2$ , el factor transcripcional sería retenido por Ure2 en el citoplasma impidiendo la inducción de la expresión de Gat2. En una cepa  $\Delta cnb1$ , los bajísimos niveles de Gat1 que además sería retenido en el citoplasma por Ure2, producirían niveles muy bajos de Gat2. Para contrastar nuestra hipótesis medimos los niveles de Gat2 en un mutante  $\Delta gat1$  y observamos que efectivamente en  $\Delta gat1$ , los niveles de Gat2 eran aproximadamente la mitad de los observados en la cepa WT (figura 38).

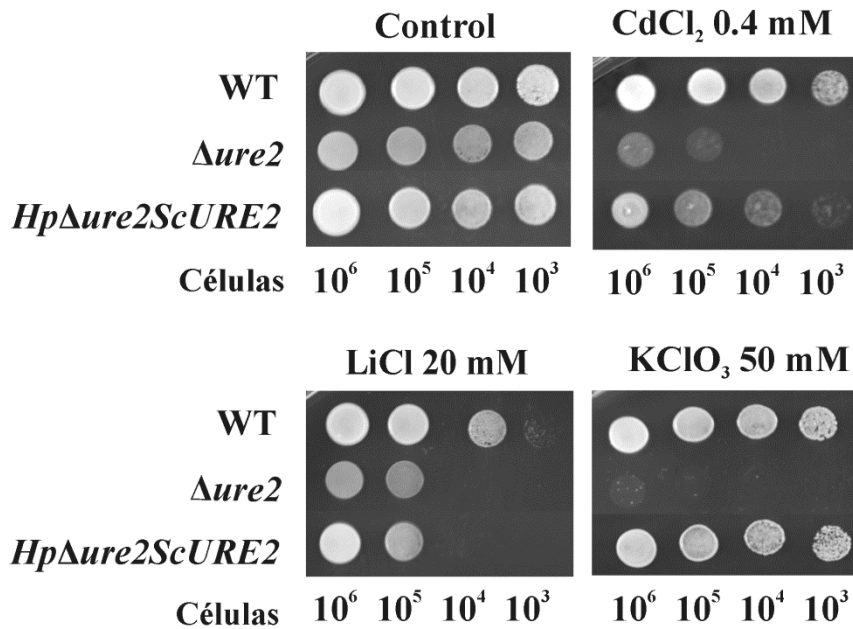


**Figura 38.** Los niveles de Gat2-HA en las cepas WT y  $\Delta gat1$  se analizaron mediante SDS-PAGE. Las células crecidas en amonio se lavaron y resuspendieron en glutamina 5 mM, amonio 5 mM o nitrato 5 mM. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína de cada cepa.

### 2.8 La expresión de *ScURE2* en $\Delta ure2$ no afecta a los niveles de activación de la calcineurina.

Tanto ScUre2 como HpUre2 presentan similitud con las glutatión S-transferasas. ScUre2 posee actividad glutatión peroxidasa (Bai *et al.*, 2004) pero su actividad glutatión S-transferasa *in vitro* aún no hay sido determinada. A pesar de ello, la interrupción de *ScURE2* causa sensibilidad a metales pesados como el Cd<sup>2+</sup> y el Ni<sup>2+</sup>, de lo que se infiere su papel en la detoxificación de metales pesados (Rai *et al.*, 2003). El ligero incremento de la sensibilidad de la cepa  $\Delta cnb1\Delta ure2$  respecto a  $\Delta cnb1$  nos hizo pensar que podría deberse al papel de HpUre2 en los procesos de detoxificación (capítulo 5). Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, *Ure2* fue sensible a Cd<sup>2+</sup> (figura 39). Para estudiar si la ausencia de las actividades enzimáticas GPx y glutatión S-transferasa asociadas a HpUre2 en  $\Delta ure2$  podría influir en la desregulación de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y en la falta de activación de la calcineurina, decidimos transformar nuestra cepa  $\Delta ure2$  con el gen *ScURE2* con el fin de analizar si *ScURE2* era capaz de complementar los fenotipos de  $Hp\Delta ure2$  relacionados con la tolerancia a sales. Para ello el gen *ScURE2* se expresó bajo el control del promotor del gen *YNR1*, regulable por la fuente de nitrógeno y altamente inducible por nitrato. En primer lugar, con el fin de verificar que *ScURE2* se expresaba bajo las condiciones de estudio utilizadas se crecieron los transformantes  $Hp\Delta ure2ScURE2$  en presencia de Cd<sup>2+</sup> y se observó que recuperaban casi completamente la tolerancia a Cd<sup>2+</sup> (figura 39). Este resultado sirvió asimismo para verificar que las actividades glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa asociadas con ScUre2 eran activas en *H. polymorpha*. Con el fin de verificar que ScUre2 era capaz igualmente de ejercer represión catabólica por nitrógeno en *H. polymorpha* decidimos medir los niveles de actividad NR de las cepas WT,  $\Delta ure2$  y de los transformantes

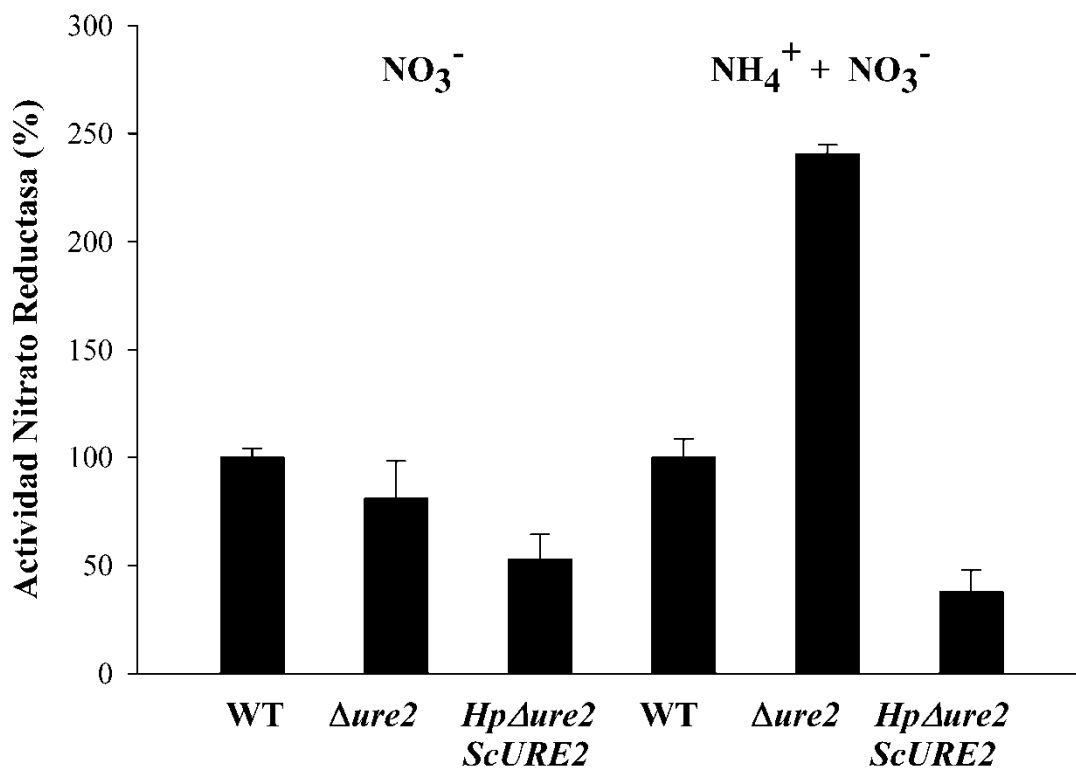
*HpΔure2ScURE2* incubando las células en presencia de amonio más nitrato. La expresión de *ScURE2* en  $\Delta ure2$  provocó la caída de la actividad NR a niveles incluso inferiores a los observados en la cepa silvestre (figura 40). De acuerdo con este resultado, los transformantes *HpΔure2ScURE2* recuperaron totalmente la tolerancia a clorato (figura 39) lo que nos permitió concluir que ScUre2 es capaz de ejercer represión catabólica por nitrógeno en *H. polymorpha*. Sin embargo, si bien la expresión de *ScURE2* fue capaz de restituir la tolerancia a  $Cd^{2+}$  y la actividad NR en condiciones de represión, no sucedió lo mismo con la tolerancia a  $Li^+$  (figura 39) ni con la actividad NR en nitrato (figura 40).



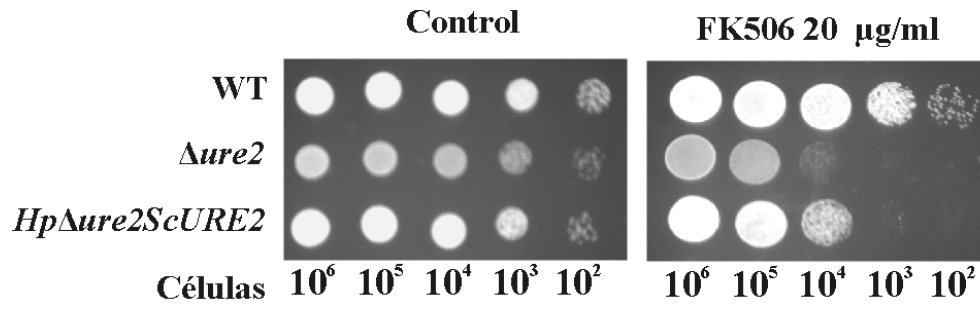
**Figura 39.** La expresión de *ScURE2* en  $\Delta ure2$  revierte su sensibilidad a  $Cd^{2+}$  y clorato pero no a  $Li^+$ . Las cepas WT,  $\Delta ure2$  y *HpΔure2ScURE2* se sembraron en placa mediante goteo en medio con  $NH_4Cl$  5 mM más  $NaNO_3$  1 mM con  $CdCl_2$ ,  $LiCl$ , o  $KClO_3$  a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a  $37^\circ C$  durante 2 días.

Estos resultados indicaban que ScUre2 no es capaz de actuar sobre la vía de la calcineurina tal como lo hace HpUre2, por lo que los transformantes *HpΔure2ScURE2* seguían manteniendo bajos niveles de activación de la calcineurina y como resultado baja expresión de *ENAI* y de *YNRI*. Para contrastar esta hipótesis estudiamos el

crecimiento de los transformantes *HpΔure2ScURE2* en presencia de FK506. Se observó que la expresión de *ScURE2* no fue capaz de revertir el fenotipo de sensibilidad a FK506 de *Δure2* (figura 41). Estos resultados sugerían que ScUre2 es capaz de unir y retener a HpGat1, pero no a HpGat2, en el citoplasma en presencia de fuentes preferidas de nitrógeno, de forma que no es capaz de regular los niveles de HpGat1 a través de la regulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , en la que participa HpGat2, y de la activación de la calcineurina.

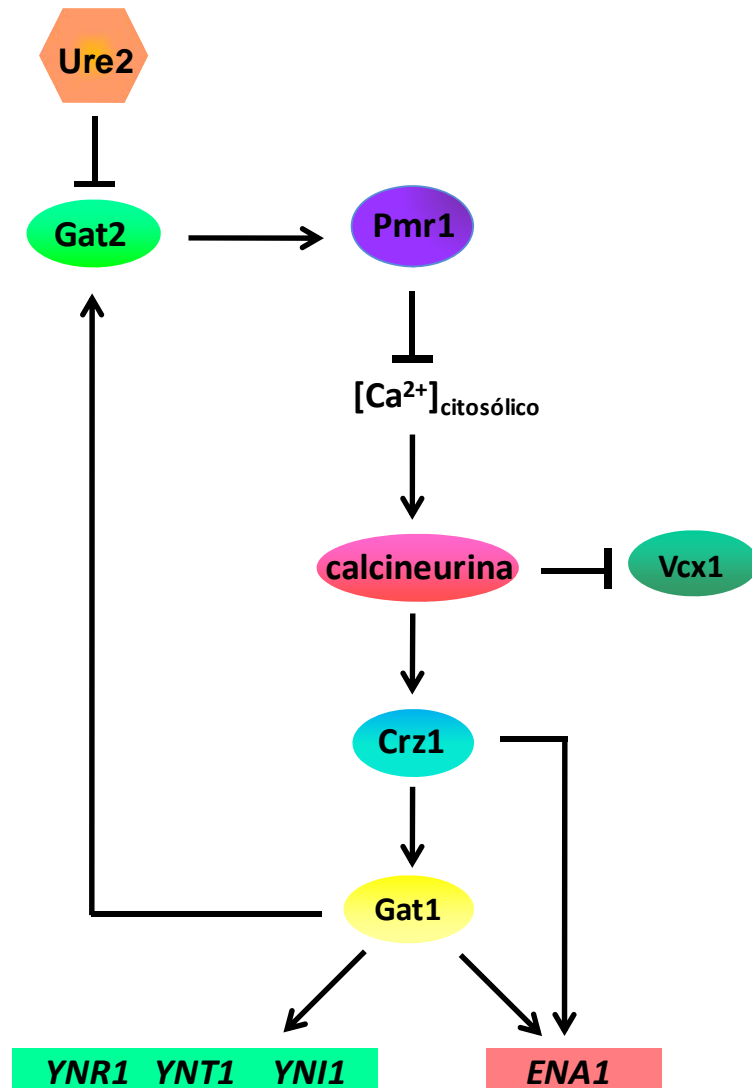


**Figura 40. Actividad NR en las cepas WT, *Δure2* y *HpΔure2ScURE2*.** Las células crecidas en amonio hasta una  $DO_{660}$  de 2-3, se lavaron e incubaron en nitrato 5 mM (izquierda) o en amonio 5 mM más nitrato 2.5 mM (derecha). El gráfico muestra la actividad media de cuatro experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar. El 100 % de actividad del WT corresponde a  $20.9 \pm 7.5$  y  $8.9 \pm 4.2$  nmoles nitrito.  $min^{-1}$ . (mg de proteína) $^{-1}$  en células incubadas en nitrato, y en amonio más nitrato, respectivamente.



**Figura 41. La expresión de *ScURE2* en  $\Delta ure2$  no afecta a los niveles de activación de la calcineurina.** Las cepas WT,  $\Delta ure2$  y  $Hp\Delta ure2 ScURE2$  se sembraron en placa mediante goteo en medio con  $NH_4Cl$  5 mM más  $NaNO_3$  1 mM con FK506. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Todos los resultados expuestos hasta el momento nos permiten esbozar un modelo de regulación de *ENA1* y de los genes sensibles a RCN que engloba a *Ure2*, a los factores GATA, *Gat1* y *Gat2* y a la calcineurina (figura 42).



**Figura 42. Modelo del papel de *Ure2* en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , la asimilación de nitrógeno y la tolerancia a sales.** *Ure2* regula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular vía *Gat2*, que induce la expresión de *PMR1*. El contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el Retículo endoplasmático-Golgi regula su entrada en la célula. Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos modulan la activación de la calcineurina y ésta, a su vez, induce la expresión de *ENA1* y los genes responsables de la asimilación de nitrógeno a través de *Gat1*-*Crz1* o *Crz1*. Las líneas que terminan en punta indican regulación positiva. Las líneas que terminan en barras indican inhibición. El modelo asume que bajo ciertas circunstancias *Ure2* retiene a *Gat1* en el citoplasma y que *Gat2* es transcripcionalmente activado por *Gat1*.

**SINOPSIS (CAPÍTULOS I-II)**

*HpURE2* es un gen altamente pleiotrópico. Su delección conlleva múltiples fenotipos fácilmente observables como sensibilidad a rapamicina, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, SDS, FK506 o resistencia a higromicina B. Estas características revelan la existencia de algunas similitudes con su ortólogo en *S. cerevisiae* y lo que es más importante, notables diferencias.

Una de las similitudes la encontramos en la fosforilación de la proteína. Hemos visto que Ure2 se fosforila en respuesta a fuentes nitrogenadas preferidas y se desfosforila bajo condiciones de ayuno de nitrógeno y en presencia de rapamicina. Estos resultados confirman la observación previa de que en *H. polymorpha* la vía de las quinasas TOR responde a la fuente de nitrógeno y regula la expresión de los genes de la asimilación de nitrógeno. En este contexto, el estado de fosforilación de Ure2 podría modular su interacción con los factores GATA tal como ocurre en *S. cerevisiae*.

Una de las diferencias más importantes entre HpUre2 y ScUre2 es su papel en la respuesta al estrés salino. Mientras *HpΔure2* presenta sensibilidad a estos cationes, *ScΔure2* es resistente. La mayor acumulación de Li<sup>+</sup> y la baja expresión de *ENAI* en *HpΔure2* dan cuenta de dicha sensibilidad. Por su parte la baja expresión de *PMAI* descarta que la entrada de cationes esté favorecida. Como ocurre en *S. cerevisiae*, tanto la calcineurina como Gat1 regulan la expresión de *ENAI* positivamente ya que cepas carentes de Gat1 y Cnb1 muestran bajos niveles de expresión del gen. Dos nuevos descubrimientos abrieron nuevas perspectivas en esta interesante proteína. En primer lugar, Ure2 regula claramente los niveles de Ca<sup>2+</sup> a través de Gat2. En segundo lugar, este proceso es el responsable del estado de activación de la calcineurina y lo que es más importante, de los niveles de Gat1.

En relación a los bajos niveles de Ca<sup>2+</sup> en *Δure2*, observamos que la ausencia de Ure2 conducía a una mayor inducción de *PMR1*, presumiblemente como consecuencia de la entrada en el núcleo de un factor GATA. La baja expresión de *PMR1* en *Δgat2* y los elevados niveles de Gat2 en *Δure2* nos permitieron elucidar que el responsable de dicha inducción era Gat2. En *S. cerevisiae*, la cantidad de Ca<sup>2+</sup> almacenada en el retículo, que depende directamente de los niveles de expresión de *PMR1*, induce una señal que modula la entrada extracelular de Ca<sup>2+</sup>. De acuerdo con dicho mecanismo, en *H. polymorpha* los elevados niveles de Pmr1 en *Δure2* conducirían a un descenso en la



entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando en niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos bajos. De acuerdo a nuestra hipótesis, la delección de *GAT2* en  $\Delta ure2$  restauró los niveles de expresión de *PMR1* y de  $\text{Ca}^{2+}$  a los existentes en una cepa silvestre.

Puesto que el  $\text{Ca}^{2+}$  activa la calcineurina en respuesta a diferentes estímulos, esperábamos una pobre activación de la calcineurina en  $\Delta ure2$ . De acuerdo con dicha hipótesis observamos un fuerte paralelismo fenotípico entre  $\Delta ure2$  y  $\Delta cnb1$ : (1) las dos cepas fueron sensibles a  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  and SDS, (2)  $\Delta ure2\Delta cnb1$  presentó una sensibilidad próxima a  $\Delta cnb1$ , (3) la expresión de *ENAI* así como los niveles de Gat1 fueron bajos en ambas cepas, (4)  $\Delta ure2$  fue muy sensible a FK506 y (5) la expresión dependiente de calcineurina, evidenciada a través de la expresión de la secuencia reportera *4-CDRE-lacZ*, fue menor en  $\Delta ure2$ . Estos resultados nos permitieron entender la escasa inducción de *ENAI* en  $\Delta ure2$  en respuesta a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  y lo que es más importante, determinamos que la regulación de Gat1 por parte de la calcineurina juega un papel muy importante en la desrepresión de los genes de asimilación de nitrógeno. Los resultados obtenidos por el grupo hasta el momento indicaban que la RCN está casi completamente abolida en  $\Delta ure2$ . En este sentido HpUre2 parece actuar como en *S. cerevisiae*, reteniendo fuera del núcleo a los factores GATA cuando el medio contiene una fuente de nitrógeno preferida. Sin embargo, en  $\Delta ure2$  la desrepresión de los genes de asimilación de nitrato en presencia de nitrato está afectada de forma negativa. Ahora sabemos que se debe a los bajos niveles de Gat1 presentes en  $\Delta ure2$ .

La expresión de *ScURE2* en Hp $\Delta ure2$  nos reveló que HpUre2 exhibe una regulación más compleja y amplia que ScUre2. Así, ScUre2 recuperó la tolerancia a  $\text{Cd}^{2+}$  y la RCN de  $\Delta ure2$ . Este rescate está asociado con la actividad GST y GPx de ScUre2 y con su capacidad para retener a HpGat1 fuera del núcleo en presencia de fuentes preferidas de nitrógeno como el amonio. Sin embargo, la tolerancia a  $\text{Li}^+$  y la actividad NR no fueron complementadas, indicando la incapacidad de ScUre2 de activar la calcineurina en Hp $\Delta ure2$ . Estos resultados están de acuerdo con el mecanismo de acción de HpUre2, es decir, de su capacidad para interactuar directamente con Gat1 pero también indirectamente controlando sus niveles a través de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y de la activación de la calcineurina. Sin embargo, ScUre2 parece interactuar únicamente con HpGat1 mientras que HpUre2 lo haría tanto con HpGat1 como con HpGat2, involucrado en la expresión de *PMR1* y por tanto en el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Finalmente, la menor actividad H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plásmática en  $\Delta ure2$  podría ser consecuencia, además de la menor expresión de *PMA1*, de los bajos niveles de Ca<sup>2+</sup> de la cepa. En ese sentido en *S. cerevisiae*, existen evidencias acerca de la conexión del metabolismo del calcio y la activación inducida por glucosa de la H<sup>+</sup>-ATPasa (Trópia *et al.*, 2006). Recientemente se ha propuesto que el incremento en las concentraciones de calcio mediado por glucosa actuaría como una señal para la activación de Pma1, de forma dependiente a Pkc1 (Pereira *et al.*, 2008). Es importante destacar que los mecanismos de regulación que controlan la actividad de Pma1 son principalmente postraduccionales (Portillo, 2000).

En resumen, se ha elucidado el papel central que juega Ure2 en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y su implicación en la activación de la vía de la calcineurina y la H<sup>+</sup>-ATPasa.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jbc.org/content/suppl/2010/09/29/M110.146902.DC1.html>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 48, PP. 37551–37560, NOVEMBER 26, 2010  
 © 2010 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

## Ure2 Is Involved in Nitrogen Catabolite Repression and Salt Tolerance via $\text{Ca}^{2+}$ Homeostasis and Calcineurin Activation in the Yeast *Hansenula polymorpha*\*<sup>§</sup>

Received for publication, May 20, 2010, and in revised form, September 22, 2010. Published, JBC Papers in Press, September 29, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.146902

Celia Rodríguez<sup>‡1</sup>, Paula Tejera<sup>‡2</sup>, Braulio Medina<sup>‡</sup>, Rosa Guillén<sup>‡3</sup>, Ángel Domínguez<sup>§5</sup>, José Ramos<sup>¶</sup>, and José M. Siverio<sup>‡4</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedical Technologies, Nitrogen Metabolism Group, Universidad de La Laguna, E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain, the <sup>§</sup>Dpto. de Microbiología y Genética, CIETUS, IMB/CSIC, Universidad de Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain, and the <sup>¶</sup>Laboratorio de Microbiología Agrícola, Departamento de Microbiología, Campus de Rabanales-Ed. C6, Universidad de Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

Disruption of *HpURE2* resulted in a low expression of genes encoding nitrate-assimilatory proteins; sensitivity to  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{Cd}^{2+}$ ; no induction of *ENAI1*; low levels of the GATA-type transcription factor Gat1; and low intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Gat1 levels were also very low in a  $\Delta\text{cnb1}$  mutant lacking the regulatory subunit of calcineurin. The strain  $\Delta\text{ure2}$  was very sensitive to the calcineurin inhibitor FK506 and displayed several phenotypes reminiscent of  $\Delta\text{cnb1}$ . The reporter *4xCDRE-lacZ*, containing calcineurin-dependent response elements in its promoter, revealed that calcineurin activation was reduced in *Hp $\Delta\text{ure2}$* . Expression of *ScURE2* in  $\Delta\text{ure2}$  rescued nitrogen catabolite repression and  $\text{Cd}^{2+}$  tolerance but not those phenotypes depending on calcineurin activation, such as salt tolerance and nitrate assimilation gene derepression. *Hp $\Delta\text{ure2}$*  showed an increased expression of the gene *PMR1* encoding the Golgi  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, whereas that of *PMCI* encoding the vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase remained unaltered. *PMR1* up-regulation was abolished by deletion of the GATA-type transcription factor *GAT2* in a *Hp $\Delta\text{ure2}$*  genetic background, and normal  $\text{Ca}^{2+}$  levels were recovered. Moreover, overexpression of *GAT2* or *PMR1* yielded strains mimicking the phenotype of the *Hp $\Delta\text{ure2}$* . This suggests that the low  $\text{Ca}^{2+}$  levels in the *Hp $\Delta\text{ure2}$*  mutant are due to the high levels of Pmr1 that replenish the Golgi  $\text{Ca}^{2+}$  content, thus acting as a negative signal for  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the cell. We conclude that *HpUre2* is involved in salt tolerance and also in nitrate assimilation gene derepression via  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis

regulation and calcineurin activation, which control the levels of Gat1.

In *Saccharomyces cerevisiae*, Ure2 plays a central role in nitrogen catabolite repression (NCR)<sup>5</sup> (i.e. the genes related to the utilization of poor nitrogen sources are repressed in the presence of preferred nitrogen sources) (1). The first insights into *URE2* were obtained by Lacroute *et al.* (2, 3), who isolated *ure2* mutants incapable of carrying out NCR. They also isolated [URE3], a non-Mendelian, non-mitochondrial mutation with the same phenotype as *ure2* (4, 5). [URE3] later proved to be an altered form of Ure2 inherited by prion mechanisms (6). NCR involves the localization of GATA-type transcription factors Gln3 and Gat1 outside the nucleus, in the presence of preferred nitrogen sources. This prevents the expression of genes related to the utilization of poor nitrogen sources. In this framework, Ure2 is involved in cytoplasm localization of Gln3 (1, 7–9). Several studies show the relationship between the TOR signaling pathways and NCR. Thus, in the presence of the Tor (target of rapamycin) kinase inhibitor rapamycin, both Gat1 and Gln3 are present in the nucleus, as occurs in poor nitrogen sources; in addition, Ure2 was found to be phosphorylated (7, 10, 11). The  $\Delta\text{ure2}$  strain also shows an improvement in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$  tolerance, this being due to the induction of the  $\text{Na}^+$  extrusion ATPase gene, *ENAI1*, which is positively modulated by Gat1 and Gln3 (12). Likewise, *URE2* deletion suppresses the sensitivity of calcineurin mutants to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , and  $\text{Mn}^{2+}$ , increasing their survival during treatment with mating pheromones; this depends on Gln3 and Ena1 (13). Molecular cloning of *URE2* by Magasanik's group, besides confirming its role in NCR, revealed that it encodes a protein with high similarity to glutathione S-transferases (GST) (14). Despite this, such *in vitro* activity has not yet been detected. However, Cooper and co-workers (15) found that  $\Delta\text{ure2}$  mutants are hypersensitive to cadmium and nickel ions and hydrogen peroxide. Nevertheless, using recombinant Ure2, glutathione peroxidase (GPx) activity

\* This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Grants BFU2007-60172/BMC (to J. M. S.) and BFU2008-04188-C03-03 (to J. R.), and by Junta de Castilla y León, Spain, Grants GEN2006-27775-C2-E/PAT and (SA141A08) (to A. D.).

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables I–IV and Figs. S1–S4.

<sup>1</sup> Recipient of predoctoral fellowships from CajaCanarias and the ACIISI from Gobierno de Canarias.

<sup>2</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. Present address: Dept. of Environmental Health, Harvard School of Public Health, 677 Huntington Ave., Boston, MA 02115.

<sup>3</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from the Agencia Española de Cooperación Iberoamericana. Present address: Dpto. de Biología Molecular y Genética, Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Río de la Plata y Lagerenza E-2511 Asunción, Paraguay.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed: Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Av. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain. Tel.: 34-922318406; Fax: 34-922318354; E-mail: jsiverio@ull.es.

<sup>5</sup> The abbreviations used are: NCR, nitrogen catabolite repression; GPx, glutathione peroxidase; NR, nitrate reductase; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; CDRE, calcineurin-dependent response element; ER, endoplasmic reticulum.

### Role of *HpUre2* in Nitrogen-Gene Expression and Salt Tolerance

with cumene hydroperoxide, hydrogen peroxide, or *tert*-butyl-hydroperoxide as substrates has been reported (16).

*Hansenula polymorpha* is able to use nitrate as sole nitrogen source. Nitrate enters cells via the high affinity nitrate transporter Ynt1 (17–19). It is reduced to ammonium by the consecutive action of nitrate and nitrite reductase. *YNT1*, *YNR1*, and *YNI1* genes, respectively, encode the main high affinity nitrate transporter, nitrate reductase (NR) and nitrite reductase. These three genes are subjected to NCR in response to preferred nitrogen sources, such as ammonium or glutamine (19, 20). Their expression is also dependent on nitrate induction mediated by two Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcriptional factors, Yna1 and Yna2 (20). However, the mechanisms underlying NCR in *H. polymorpha* are unknown. In *Neurospora crassa*, the protein NMR1 is involved in the negative modulation of nitrate assimilation genes and others involved in the utilization of non-preferred nitrogen sources. NMR1 interacts with the GATA factor NIT2 in the presence of preferred nitrogen sources to prevent NIT2-dependent gene transcription (21, 22). In *Aspergillus nidulans*, NmrA acts similarly to NMR1, on the GATA factor AreA (23). However, neither NMR1 nor NmrA is similar to Ure2. Moreover, *gsta*, a *URE2* ortholog in *A. nidulans*, is not involved in NCR but contributes to heavy metal and xenobiotic compound tolerance (24).

Because the nitrate assimilatory pathway in the yeast *H. polymorpha* is known to be subject to NCR, we investigated the mechanism involved. One question was whether NCR is framed within Ure2 activity in *H. polymorpha*, as in *S. cerevisiae*, or via mechanisms closer to those reported for filamentous fungi. Once we found that Ure2 was involved in *H. polymorpha* NCR, we focused on its mechanisms of action because these have only been studied in depth in *S. cerevisiae*.

We found that *HpΔure2* showed sensitivity to Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup>, in contrast to *S. cerevisiae*, and an unexpected drop in nitrate assimilation gene expression. We concluded that Ure2 is involved in nitrogen catabolite repression and salt tolerance via Ca<sup>2+</sup> homeostasis and calcineurin in *H. polymorpha*.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Yeast Strains and Growth Conditions**—The *H. polymorpha* strains used in this work and their genotypes are listed in supplemental Table I. All strains are derivatives of NCYC495 leu2 ura3 strain. The wild type (WT) was obtained by transforming this strain with integrative vectors bearing *HpURA3* and *HpLEU2*. Yeast cells were grown with shaking at 37 °C in YPD medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) or synthetic medium containing 0.17% (w/v) yeast nitrogen base, without amino acids and ammonium sulfate (Difco), 2% (w/v) glucose, and the nitrogen source indicated in each case. Synthetic medium containing 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 2% (w/v) glucose buffered to pH 5.5 with 50 mM MES-Tris (buffered synthetic medium) was used in some experiments. Whenever necessary, media were supplemented with 0.23 mM leucine and 0.19 mM uracil.

**Nucleic Acid Isolation and Quantitative Real-time PCR**—Yeast DNA and λ DNA were isolated as described elsewhere (25). Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit<sup>TM</sup>, according to the manufacturer's instructions (Qiagen). RNA

integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining and A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio. Genomic DNA was removed with 10 units of RNase-free DNase (Roche Applied Science) for each 10 μg of RNA. DNase treatment efficiency was checked by the absence of PCR products using *HpACT1* as a template. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed using the commercial TaqMan<sup>®</sup> kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was carried out in the iCycler iQ real-time PCR detection system (Bio-Rad) using the Fast Start SYBR Green Master mix (Roche Applied Science). Four serial dilutions of cDNA, 3 μl of each, were amplified in triplicate for each amplicon in a volume of 20 μl. The relative changes in gene expression from qRT-PCR experiments were analyzed as described (26). *HpACT1* was used as a reference gene.

**Gene Disruption and Yeast Vectors**—*URE2*, *CNB1*, *GAT1*, *GAT2*, and *PMC1* disruption is described in the supplemental material. All of the primer sets for PCR-mediated gene disruption, tagging, or qRT-PCR are described in supplemental Table II. All vectors are described in supplemental Table III.

**nURE2, nGAT2, and nPMR1**—Strains bearing several copies of *URE2* (*nURE2*) *GAT2* (*nGAT2*), or *PMR1* (*nPMR1*) were obtained by multiple integration of vectors *pGEM-URE2-URA3*, *pGEM-GAT2-URA3*, and *pGEM-PMR1-LEU2*. These contain the genes *URE2*, *GAT2*, and *PMR1* and were linearized at the *URA3* marker gene with BglII or at the *LEU2* marker gene with BstII to facilitate target integration.

**lacZ Gene Fusions**—The *pHPI 359* vector (27) was used to fuse *ENA1* and *PMR1* gene promoters to *lacZ*, yielding *pENA1-lacZ* and *pPMR1-lacZ*. The regions from –1164 to +39 relative to the ATG of *ENA1* and –1009 to +39 of the *PMR1* were amplified by PCR using Pfu from genomic DNA using the primers *ENA1-lacZ-F* and *ENA1-lacZ-R* for *ENA1* and using *PMR1-lacZ-F* and *PMR1-lacZ-R* for *PMR1*. The vector *pAMS367* bearing *1xCDRE-lacZ* (kindly provided by M. Cyert, Stanford University) was modified at the *StuI* site by introducing the *H. polymorpha LEU2* marker.

**Growth Tests**—The sensitivity of different yeast strains to cations and other compounds was assayed by a drop test. Strains were grown in YPD liquid medium, and then cultures were diluted to obtain 10<sup>6</sup> to 10<sup>2</sup> cells in 5 μl and then spotted on solid medium.

**Epitope Tagging of Ure2, Gat1, and Gat2**—Ure2, Gat1, and Gat2 were tagged at their C termini with six copies of the peptide epitope from the HA protein of human influenza virus using the vector *pHA1*. This vector derives from *pANL31* (28), which contains the *eGFP* (green fluorescence protein) ORF and the zeocin resistance marker (*ble*). The *eGFP* sequence was replaced by a 256-bp fragment containing six copies of the IIA epitope obtained by PCR using the pair of oligonucleotides tagF and tagR from the *S. cerevisiae* vector pYM3 (29). The +1 to +905 DNA region from *URE2* was amplified by PCR using the primers Ure2exp-F and Ure2-HA-tag-R, the +401 to +1523 DNA region from *GAT1* was amplified using the primers GAT1GFP-F and GAT1GFP-R, and the +46 to +1278 DNA region from *GAT2* was amplified using the primers GAT2-HA-F and GAT2-HA-R. All sequences were cloned in frame with the 6HA sequence to render the vectors *pHA-URE2*, *pHA-*

## Role of HpUre2 in Nitrogen-Gene Expression and Salt Tolerance

*GAT1*, and *pHA-GAT2*. These were linearized at the BclI, NarI, and NruI sites, respectively, to facilitate their homologous integration and used to transform yeast. Transformants were selected by growth on YPD plates containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zeocin<sup>TM</sup> (Invitrogen). HA tagging was confirmed by PCR with primers designed to bind outside the construct (C-URF2-F, C-GAT1-F, and RT-DAL80-F) and at the HA epitope (tagR). Western blot analysis using anti-HA antibody (Roche Applied Science) provided further confirmation.

**SDS-PAGE and Immunoblot**—Crude extracts were obtained from 100 mg of cells in a FastPrep device (Thermosavant LifeSciences) after 20 s at 6.0 m/s with 300  $\mu\text{l}$  of Lysis Buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 10 mM NaF, 1 $\times$  Complete Miniprotease inhibitor mixture (Roche Applied Science), 2 mM PMSF, 1 mM benzimidazole, and 0.5-mm diameter glass beads. The supernatant resulting from the low speed centrifugation of extracts (820  $\times g$  for 1 min) was clarified at 10,580  $\times g$  for 10 min at 4 °C and mixed with 4 $\times$  Sample Buffer (4 $\times$  Sample Buffer: 12% (w/v) SDS, 6% (v/v) 2-mercaptoethanol, 30% (w/v) glycerol, 0.05% (w/v) Serva blue G, 150 mM Tris-HCl, pH 7). Samples were heated at 95 °C for 7 min and then subjected to SDS-PAGE and immunoblot. Mouse monoclonal anti-HA antibodies (1:1000; Roche Applied Science) and Immobilon Western (Millipore) were used to detect Ure2, Gat1 and Gat2.

**Measurement of Ca<sup>2+</sup> Intracellular Content**—Ca<sup>2+</sup> content of the cells was determined as described previously (30). Briefly, samples of cells were filtered, washed twice with ice-cold 100 mM MgCl<sub>2</sub>, and extracted with 100 mM HCl. Ca<sup>2+</sup> was determined by atomic absorption spectrophotometry.

**DNA Sequencing**—DNA sequencing was performed using Ampliqaq polymerase with a BigDye Terminator version 3.1 cycle sequencing kit on an automated DNA sequencer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer).

**Miscellaneous Methods**—Yeast cells were electrotransformed as described previously (31).  $\beta$ -Galactosidase activity was determined as in Ref. 27. Determinations of lithium influx and efflux were previously described (32).

## RESULTS

**Molecular Cloning and Sequence Analysis of HpURE2**—An HpURE2 partial DNA sequence is present in the *H. polymorpha* genome data base (Genolévures) (33). Based on this sequence, a 462-bp DNA fragment was obtained by PCR and used to screen an *H. polymorpha*  $\lambda$ EMBL3 genomic library (34). Several phages were isolated, and DNA sequencing of the phage  $\lambda$ 12 revealed the presence of the whole HpURE2 ORF, along with other ORFs. This contained 906 bp encoding a protein of 34.3 kDa. The sequence of HpURE2 has been deposited in GenBank<sup>TM</sup> under accession number AJ698949.

BLASTp analysis revealed the highest identity of HpUre2, about 70%, with Ure2 of different yeasts, such as *Debaryomyces hansenii*, *Pichia stipitis*, *Candida maltosa*, and *Candida albicans*. The identity with ScUre2 decreases to 63%. Identity was also found with different members of the GST superfamily. For more details, see the supplemental material.

**TABLE 1**  
NR activity of WT and  $\Delta$ ure2 strains

Cells were grown in synthetic medium plus 5 mM ammonium to an OD<sub>660</sub> of 2–3, washed, and incubated with 5 mM nitrate or with 2.5 mM nitrate plus 5 mM ammonium for 2 h. NR activity is expressed as a percentage  $\pm$  S.E. from four independent experiments. 100% NR activity of WT corresponds to 20.9  $\pm$  7.5 and 8.9  $\pm$  4.2 nmol of nitrite $\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg of protein})^{-1}$  in cells incubated in nitrate and ammonium plus nitrate, respectively.

	NR activity	
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
	%	%
WT	100	100
$\Delta$ ure2	85 $\pm$ 27.4	258 $\pm$ 50.4
$\Delta$ ure2 URE2	115 $\pm$ 14.2	116 $\pm$ 31.5
nURE2	105 $\pm$ 36.6	37.7 $\pm$ 20.1

**TABLE 2**  
Analysis of nitrate assimilation gene expression in WT and  $\Delta$ ure2 strains

Ammonium-grown cells of the WT and  $\Delta$ ure2 were washed and incubated in synthetic medium containing 5 mM ammonium, 5 mM nitrate, or 5 mM ammonium plus 2.5 mM nitrate. Relative expression was determined by qRT-PCR. The experiments, only one of which is shown, were repeated three times without significant differences. ND, not determined.

	Nitrate assimilation gene expression			
	$\Delta$ ure2 <sup>a</sup>		WT <sup>b</sup>	
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
YNR1	0.7	4	9700	240
YNI1	0.5	4	ND	ND
YNT1	0.6	4	ND	ND
GAP1	1.2	1	3	1
URE2	0	0	5	2

<sup>a</sup> The expression is normalized to the WT in the same medium.

<sup>b</sup> The expression is normalized to the expression in ammonium. *HpACT1* was used as reference gene.

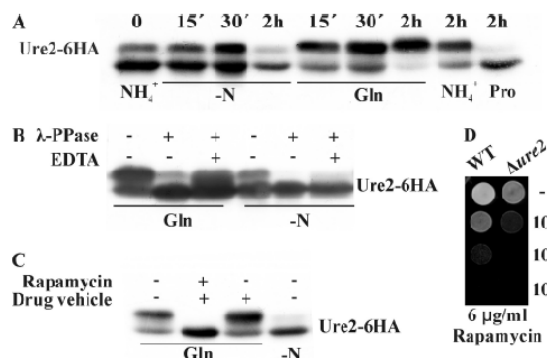
**HpUre2 Is Responsible for Nitrogen Catabolite Repression and Derepression**—To test the role of HpURE2 in NCR, a  $\Delta$ ure2 null mutant strain was obtained. NR activity, induced by nitrate and repressed by preferred nitrogen sources, was used as a read-out of NCR. In nitrate plus preferred nitrogen sources, such as ammonium, NR was higher in  $\Delta$ ure2 than WT (Table 1), indicating that NCR was almost abolished in  $\Delta$ ure2. Indeed, qRT-PCR showed that in nitrate plus ammonium, nitrate assimilation gene expression was higher in  $\Delta$ ure2 than WT (Table 2). However, it was very striking that in nitrate,  $\Delta$ ure2 presented lower NR activity than WT and also lower nitrate assimilation gene expression, indicating that these genes are not fully derepressed in the absence of URE2.

To gain further insight into HpUre2 regulation, we studied its phosphorylation state in response to rapamycin, to which Hp $\Delta$ ure2 (Fig. 1), like Sc $\Delta$ ure2, was very sensitive (35), and to nitrogen sources. As shown in Fig. 1, Ure2 was phosphorylated in response to preferred nitrogen sources, mainly in glutamine, and became dephosphorylated in synthetic medium without any nitrogen source or proline. Rapamycin also triggered Ure2 dephosphorylation.

These results allow us to conclude that URE2 is involved in NCR in *H. polymorpha*, although the lower expression of nitrate assimilation genes YNT1, YNR1, and YNI1 in  $\Delta$ ure2 also indicated a positive role of Ure2. Moreover, the HpUre2 phosphorylation state depends on the nitrogen source, most likely via the TOR signaling pathway.

**Ure2 Is Involved in Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup> Tolerance**—In *S. cerevisiae*, Ure2 is involved in salt tolerance (12, 13), which prompted us to

Role of HpUre2 in Nitrogen-Genes Expression and Salt Tolerance



**FIGURE 1. Rapamycin and nitrogen sources regulate Ure2 phosphorylation.** A, Ure2-6HA electrophoretic mobility. Ure2-6HA was analyzed by SDS-PAGE from cells grown to early exponential phase in synthetic medium plus 5 mM ammonium (time 0, lane 1), washed, and then deprived of nitrogen for 15, 30, and 120 min (lanes 2–4) or incubated 15, 30, and 120 min in synthetic medium plus 5 mM glutamine (lanes 5–7). Cells incubated for 120 min in synthetic medium plus 5 mM ammonium or 1 mM proline are also shown (lanes 8 and 9). B, the Ure2 low mobility shift band is due to phosphorylation. Protein extracts from cells deprived of nitrogen or incubated in glutamine were treated with  $\lambda$ -protein phosphatase. 50 mM EDTA was added to inhibit  $\lambda$ -protein phosphatase. C, rapamycin causes Ure2-6HA dephosphorylation. Protein extracts from Ure2-6HA strain were incubated for 120 min in 5 mM glutamine with (+) or without (–) 0.5  $\mu$ g/ml rapamycin or deprived of nitrogen. D, rapamycin growth sensitivity. Serial 10-fold dilutions of the WT and  $\Delta$ ure2 were spotted on solid medium containing YPD plus rapamycin at the indicated concentration.

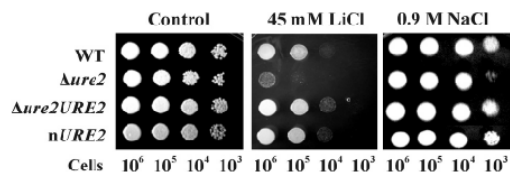
study the role of HpUre2 in  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  tolerance. For this,  $\Delta$ ure2 was tested for growth in media containing  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$  and was found to be more sensitive to these cations than WT (Fig. 2). This contrasts with *S. cerevisiae*, where  $\Delta$ ure2 shows greater  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$  tolerance than WT (12). Cation influx indicated that  $\Delta$ ure2 accumulated  $\text{Li}^+$  faster than WT. Likewise, the efflux kinetics showed that  $\Delta$ ure2 was unable to extrude  $\text{Li}^+$  as WT did (Fig. 3). Because *ENA1* encodes the main ATPase involved in  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  extrusion, we determined its expression levels in WT and  $\Delta$ ure2 by qRT-PCR.  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$  induced the level of *ENA1* in WT between 10- and 13-fold; in contrast, no induction was observed in  $\Delta$ ure2 (Fig. 4). These results reinforced our idea that efflux of these cations was impaired in  $\Delta$ ure2. The same results were found using a strain bearing the *ENA1-lacZ* construct (data not shown). Our findings allow us to conclude that Ure2 is positively involved in  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  tolerance, up-regulating *ENA1* expression.

*Ure2 Participates in the Calcineurin-dependent Response*

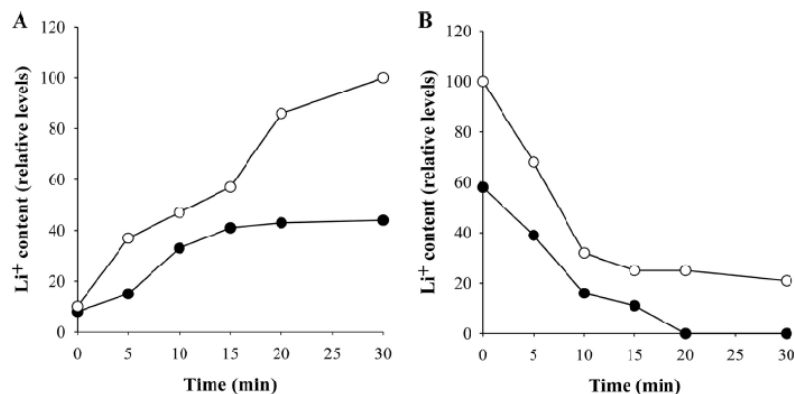
In *S. cerevisiae*, it has been shown that *ENA1* expression is subject to a complex regulatory network, where Gln3, Gat1, and calcineurin are the positive signals (12, 36, 37). However, in *HpDeltaure2*, the expected increase in *ENA1* expression and concomitant cation tolerance was not observed. This suggested that GATA factors and/or calcineurin-dependent *ENA1* expression could be negatively affected in  $\Delta$ ure2. Therefore, we tested calcineurin involvement using its inhibitor FK506 (38). We found that  $\Delta$ ure2 was very sensitive to this macrolide, even in the absence of  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$ , which further increased  $\Delta$ ure2 sensitivity to FK506 (Fig. 5). This suggested a positive effect of Ure2 on calcineurin activation. In this framework, we observed a strong parallelism between  $\Delta$ cnb1, lacking the regulatory subunit of calcineurin, and  $\Delta$ ure2, in response to  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , and SDS (Fig. 6).  $\Delta$ ure2 $\Delta$ cnb1 showed a phenotype very close to  $\Delta$ cnb1, although slightly more sensitive, indicating that Ure2 could even act beyond Cnb1 (Fig. 6). We also found that *ENA1* was scarcely expressed in response to  $\text{Na}^+$  in  $\Delta$ cnb1, as in  $\Delta$ ure2 (data not shown). These results strongly suggested that calcineurin activation in  $\Delta$ ure2 was negatively affected.

*URE2 Deletion Reduces Calcineurin-dependent Gene Expression and Total Cell  $\text{Ca}^{2+}$  Content*

The effect of Ure2 on calcineurin was measured by *4xCDFRE-lacZ* reporter (39) in WT and  $\Delta$ ure2 strains.  $\Delta$ ure2 showed about a 2.5 fold lower induction of *4xCDFRE-lacZ*, in response to  $\text{Na}^+$ , indicating poor activation of calcineurin-dependent gene expression in  $\Delta$ ure2 (Fig. 7). Because calcineurin activation is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, we studied the role of  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\Delta$ ure2 phenotypes. The addition of 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$  restored  $\Delta$ ure2 tolerance to  $\text{Li}^+$ , whereas 6 mM EGTA increased  $\Delta$ ure2 sensitivity to it (Fig. 8). We also observed that extra  $\text{Ca}^{2+}$  produced a higher *ENA1-lacZ* expression in WT than in  $\Delta$ ure2 (Fig. 9).



**FIGURE 2.  $\Delta$ ure2 is sensitive to  $\text{Li}^+$  and  $\text{Na}^+$ .** WT,  $\Delta$ ure2,  $\Delta$ ure2URE2, and nURE2 strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on pH 5.5 buffered synthetic medium plus LiCl and NaCl at the indicated concentrations. Cells were incubated at 37 °C for 2 days.



**FIGURE 3.  $\Delta$ ure2 deletion affects cell  $\text{Li}^+$  content.** A,  $\text{Li}^+$  accumulation. Cells from WT (●) and  $\Delta$ ure2 mutant (○) were grown in pH 5.5 buffered synthetic medium to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.6–1, washed, and resuspended in fresh medium containing 30 mM LiCl. Samples were taken for intracellular  $\text{Li}^+$  determination. B,  $\text{Li}^+$  efflux. Cells were loaded with 30 mM LiCl for 30 min, washed, and resuspended in  $\text{Li}^+$ -free medium, and intracellular  $\text{Li}^+$  was determined. The experiments, only one of which is shown, were repeated three times without significant differences.

Role of HpUre2 in Nitrogen-Gene Expression and Salt Tolerance

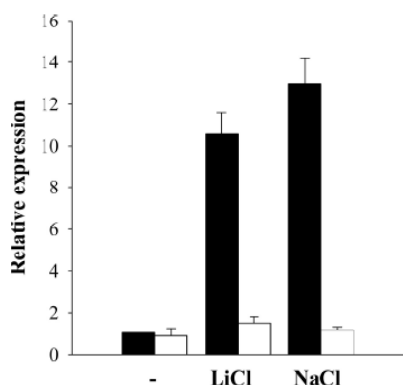


FIGURE 4. Effect of Li<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> on ENA1 gene expression in WT and Δure2 strains. Ammonium-grown cells of the WT (filled bars) and Δure2 (open bars) were washed and incubated in synthetic medium plus 5 mM ammonium, with or without 30 mM LiCl or 0.7 M NaCl, for 2 h. Relative expression was determined by qRT-PCR. Data are expressed as mean values ± S.E. (error bars) from three independent experiments. The expression is normalized to the WT expression without cations. HpACT1 was used as a reference gene.

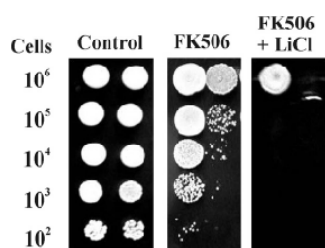


FIGURE 5. Δure2 is hypersensitive to FK506. WT (left) and Δure2 (right) strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on YPD containing 25 μg/ml FK506 with or without 30 mM LiCl. Cells were incubated at 37 °C for 2 days.

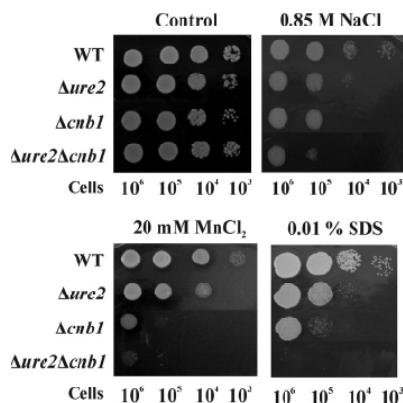


FIGURE 6. Δure2 shows phenotypes close to Δcnb1. WT, Δure2, Δcnb1, and Δure2Δcnb1 strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on pH 5.5 buffered synthetic medium plus NaCl or MnCl<sub>2</sub> or on YPD plus SDS. Cells were incubated at 37 °C for 2 days.

Furthermore, total cell Ca<sup>2+</sup> content was lower in Δure2 with respect to WT (Fig. 10). Altogether, we conclude that Ure2 is involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis and consequently in calcineurin activation.

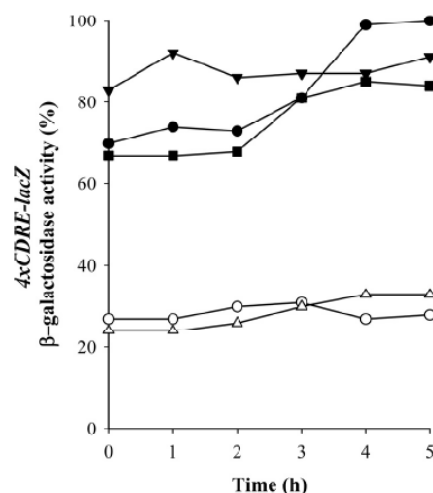


FIGURE 7. Effect of URE2 and GAT2 deletion on calcineurin-dependent gene expression. Expression was followed by assaying β-galactosidase activity in WT (●), Δure2 (○), Δgat2 (▼), nGAT2 (△), and Δure2Δgat2 (■), all bearing the 4xCDRE-lacZ construct. Cells were grown in synthetic medium plus 5 mM ammonium and then incubated in the same medium plus 0.7 M NaCl for 5 h. Experiments, only one of which is shown, were repeated three times without significant differences.

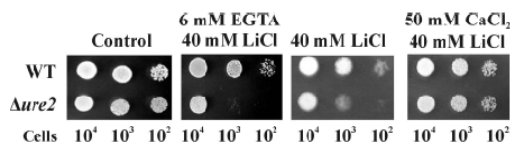


FIGURE 8. Effect of EGTA or Ca<sup>2+</sup> addition on Δure2 Li<sup>+</sup> sensitivity. WT and Δure2 strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on synthetic medium containing EGTA plus LiCl, LiCl, and CaCl<sub>2</sub> plus LiCl. Cells were incubated at 37 °C for 2 days.

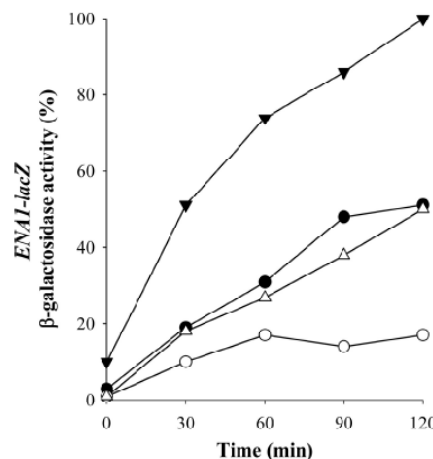


FIGURE 9. Effect of Ca<sup>2+</sup> on ENA1 gene expression in WT and Δure2 strains. ENA1 expression was followed by assaying β-galactosidase activity in WT and Δure2 bearing ENA1-lacZ. Cells were grown in synthetic medium plus 5 mM ammonium. ENA1 expression was determined in WT (●) and Δure2 (○) incubated in the same medium plus 0.7 M NaCl, and in 0.7 M NaCl plus 50 mM CaCl<sub>2</sub> in WT (▼) and Δure2 (△). Experiments, only one of which is shown, were carried out three times without significant differences.

## Role of HpUre2 in Nitrogen-Genes Expression and Salt Tolerance

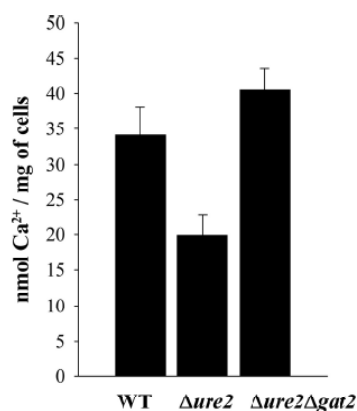


FIGURE 10. Intracellular Ca<sup>2+</sup> content in WT and Δure2 strains. Cells were grown in synthetic medium plus 5 mM ammonium to OD<sub>650</sub> 0.3. Cells were collected by filtration and analyzed by atomic absorption spectrophotometry. Values are expressed as nmol of Ca<sup>2+</sup>/mg of cells and are the mean of three measurements in three independent experiments. Error bars, S.E.

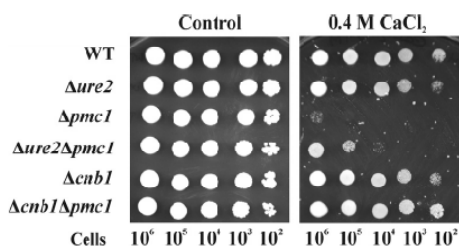


FIGURE 11. URE2 deletion causes activation of Vcx1. WT, Δure2, Δpmc1, Δure2Δpmc1, Δcnb1, and Δcnb1Δpmc1 strains were grown in YPD; serial 10-fold dilutions were spotted on synthetic medium plus 0.4M CaCl<sub>2</sub> and then incubated at 37 °C for 2 days.

To gain further insights into calcineurin activation in Δure2, we studied the activation of vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger Vcx1. In *S. cerevisiae*, calcineurin inhibits Vcx1-dependent H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. Calcineurin decreases Ca<sup>2+</sup> tolerance of *pmc1* mutants by inhibiting the function of Vcx1; this Ca<sup>2+</sup> tolerance is restored by inactivation of calcineurin (40). To test the activation of Vcx1 in Δure2, we analyzed Ca<sup>2+</sup> sensitivity of Δpmc1, Δcnb1Δpmc1, and Δure2Δpmc1. As shown in Fig. 11, Δpmc1 was very sensitive, whereas Δcnb1Δpmc1 and Δure2Δpmc1 were more resistant. As expected, Δcnb1Δpmc1 was much more tolerant to Ca<sup>2+</sup> than Δure2Δpmc1 because the latter conserves some calcineurin activity. These results also show the low activation of calcineurin in Δure2.

**Gat1 Levels Are Regulated by the Calcineurin Pathway, Being Lower in Δure2** Because *ENA1* and nitrate assimilation genes *YNT1*, *YNR1*, and *YNI1* are down-regulated in Δure2 and positively regulated by Gat1, we explored the levels of HpGat1 in Δcnb1 and Δure2. HpGat1 is a positive GATA factor also involved in nitrate assimilation gene expression in *H. polymorpha* (supplemental Figs. S1 and S2). Accordingly with *S. cerevisiae* Ure2 mechanisms, HpGat1 would enter the nucleus in the HpΔure2 strain, up-regulating *ENA1* expression. The strain Δgat1 showed Li<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> sensitivity, although less than in

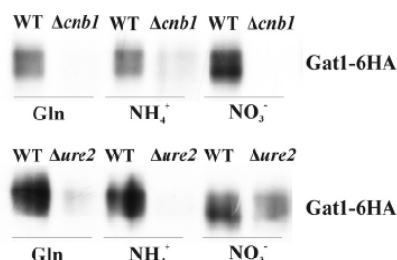


FIGURE 12. URE2 and CNB1 deletion decreases Gat1 levels. Gat1-6HA levels were analyzed by SDS-PAGE in WT, Δure2, and Δcnb1. Cells were grown to early exponential phase in synthetic medium plus 5 mM ammonium, washed, and incubated for 120 min in the same medium plus 5 mM glutamine (Gln) (lanes 1 and 2), 5 mM ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (lanes 3 and 4), or 5 mM nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (lanes 5 and 6). In A, 10 μg of protein from WT and 40 μg from Δcnb1 were analyzed; in B, 20 μg of protein from WT and Δure2 were analyzed.

Δure2, and low levels of *ENA1* expression (supplemental Figs. S3 and S4). We found that the Gat1 levels in Δure2 were very low (Fig. 12), in contrast to those found in *S. cerevisiae* (41–44). Therefore, HpURE2 deletion did not increase *ENA1* activation via Gat1 but clearly lowered it. This also explains the lower derepression of the nitrate assimilation genes *YNT1*, *YNR1*, and *YNI1* in Δure2.

The close correlation between Δure2 and Δcnb1 found throughout this work led us to ask whether Gat1 levels were calcineurin-dependent. We found that Δcnb1 showed even lower Gat1 levels than Δure2 (Fig. 12), allowing us to report for the first time in yeast that levels of a GATA transcription factor were controlled by the calcineurin signaling pathway. In accordance with this, the *GAT1* gene presents a putative calcineurin-dependent response element (CDRE) (45) in its 5'-non-coding region. Therefore, the lower levels of Gat1 present in Δure2 are consistent with the low calcineurin activation in this strain compared with WT.

To clarify if calcineurin acts on *ENA1* exclusively via Gat1, we measured the levels of *ENA1* expression in Δgat1 with or without additional 50 mM Ca<sup>2+</sup>. An increase of *ENA1* expression was observed in response to Ca<sup>2+</sup> (data not shown), suggesting that *ENA1* induction is under the dual control of calcineurin-Crz1-Gat1 and calcineurin-Crz1. This also explains the higher sensitivity of Δure2 than Δgat1 to Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup>.

**Expression of ScURE2 in HpΔure2 Does Not Rescue Calcineurin Activation**—Both ScUre2 and HpUre2 present high similarity to GSTs. ScUre2 shows GPx activity, but *in vitro* GST activity has not been reported. However, deletion of *ScURE2* causes increased sensitivity to heavy metal ions, such as Cd<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> (15). To show whether these potential enzymatic activities of HpUre2 are responsible for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and calcineurin regulation, we tested whether *ScURE2* expression was able to complement HpΔure2 phenotypes. HpΔure2ScURE2 transformants almost fully recovered Cd<sup>2+</sup> tolerance, indicating that GST and GPx activities associated with ScUre2 are active in *H. polymorpha*. NR activity in HpΔure2ScURE2 was lower than HpΔure2 in nitrate plus ammonium (supplemental Table IV). Consistent with this, HpΔure2ScURE2 fully recovered tolerance to chlorate (Fig. 13), the chlorine analog of nitrate, which is reduced by NR to the toxic chlorite (46), indicating that ScUre2 was able to



Role of *HpUre2* in Nitrogen-Gene Expression and Salt Tolerance

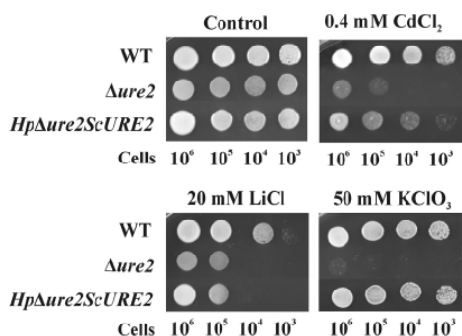


FIGURE 13. *ScURE2* expression in *HpΔure2* rescues  $\text{Cd}^{2+}$  and chlorate tolerance but not  $\text{Li}^+$  tolerance. WT,  $\Delta ure2$ , and *HpΔure2ScURE2* strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on synthetic medium containing 5 mM ammonium and 1 mM nitrate plus  $\text{CdCl}_2$ , LiCl, and  $\text{KClO}_3$  at the indicated concentrations. Cells were incubated at 37 °C for 2 days.

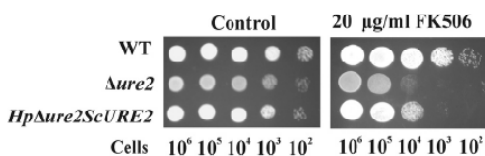


FIGURE 14. *ScURE2* expression in *HpΔure2* does not rescue FK506 tolerance. WT,  $\Delta ure2$ , *HpΔure2ScURE2* strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on synthetic medium containing 5 mM ammonium and 1 mM nitrate plus FK506. Cells were incubated at 37 °C for 2 days.

exert NCR in *H. polymorpha*. However, *ScURE2* expression did not rescue either  $\text{Li}^+$  tolerance (Fig. 13) or NR activity levels (supplemental Table IV). These levels were lower in *HpΔure2ScURE2* than in WT, in both nitrate and nitrate plus ammonium (supplemental Table IV). In nitrate, NR activity is consistently lower in *ScURE2HpΔure2* than in *HpΔure2*; this could be due to the low levels of Gat1 in this strain and also to the capacity of *ScUre2* to bind Gat1 even in the presence of a non-preferred nitrogen source like nitrate (supplemental Table IV). Therefore, these results indicate that *ScUre2* was unable to activate calcineurin as *HpUre2* does. The sensitivity of *HpΔure2ScURE2*, like that of *Δure2* to FK506 is consistent with this (Fig. 14).

*PMR1* Expression Is Regulated by *Ure2* through *Gat2*—To maintain cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in *S. cerevisiae*, calcineurin regulates the expression of *PMC1* and *PMR1*, encoding P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases involved in  $\text{Ca}^{2+}$  transport into the vacuole and ER-Golgi, respectively (47, 48). Analysis of *PMR1* and *PMC1* gene expression in *H. polymorpha* revealed that *PMR1-lacZ* levels were higher in  $\Delta ure2$  than WT, whereas *PMC1* expression remains unaltered in  $\Delta ure2$  (Fig. 15). Moreover, adding extra  $\text{Ca}^{2+}$  produced higher induction in WT than in  $\Delta ure2$  (Fig. 15). This result suggests that the lower levels of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  observed in  $\Delta ure2$  are due to the constitutively high *PMR1* expression because this would increase ER-Golgi  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment, and as a result,  $\text{Ca}^{2+}$  entry into cells would decrease. In *S. cerevisiae*, the  $\Delta pmr1$  mutant considerably increases  $\text{Ca}^{2+}$  entry into cells via a capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry, similar to that found in mammals (49–51). In light of the current *S. cerevisiae* *Ure2* mode of action, in *HpΔure2* a GATA factor would enter the nucleus, activating *PMR1*. Analysis of

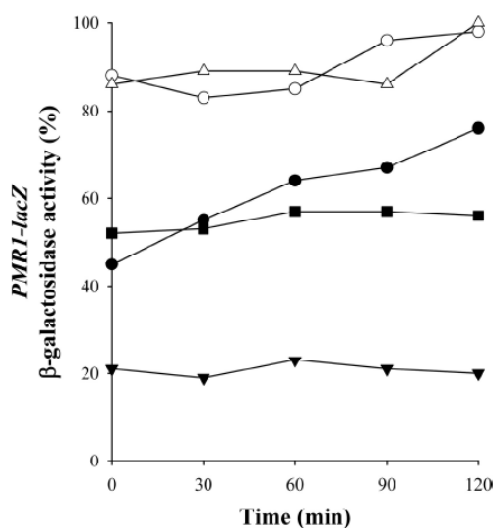


FIGURE 15. Effect of *URE2* and *GAT2* deletions on *PMR1* gene expression. *PMR1* expression was determined by assaying  $\beta$ -galactosidase activity in WT ( $\bullet$ ),  $\Delta ure2$  ( $\circ$ ),  $\Delta gat2$  ( $\blacktriangledown$ ), nGAT2 ( $\triangledown$ ), and  $\Delta ure2\Delta gat2$  ( $\blacksquare$ ) bearing *PMR1-lacZ*. Cells were grown in synthetic medium plus 5 mM ammonium and then incubated in the same medium plus 5 mM  $\text{CaCl}_2$  for 2 h. Experiments, only one of which is shown, were repeated three times without significant differences.

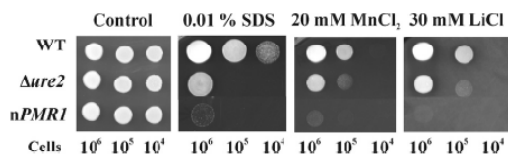


FIGURE 16. *PMR1* overexpression (*nPMR1*) reproduces  $\Delta ure2$  phenotypes. Cells were grown in YPD; serial 10-fold dilutions were spotted on synthetic medium plus 0.01% SDS, 20 mM  $\text{MnCl}_2$ , and 30 mM LiCl and then incubated at 37 °C for 2 days.

*PMR1* expression in strains lacking the positive GATA factors *HpGAT1*, *HpGLN3*, and *HpGAT2* revealed low *PMR1* expression in  $\Delta gat2$ , even in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 15). *HpGat2* presents a close sequence similarity with *ScGat1* and *HpGat1* (supplemental Figs. S1 and S2). Nevertheless, its deletion has no effect on  $\text{Li}^+$  and  $\text{Na}^+$  sensitivity, unlike *Gat1* (supplemental Fig. S3). In accordance with the observed role of *Gat2* in regulating *PMR1*, a strain bearing multicopy *GAT2* (*nGAT2*) showed high *PMR1* expression levels, equal to those seen in  $\Delta ure2$ . On the other hand, *GAT2* deletion to obtain  $\Delta ure2\Delta gat2$  restored *PMR1* expression to those levels observed in WT (Fig. 15). We also determined calcineurin-dependent gene expression by *4xCDRE-lacZ* in  $\Delta gat2$ ,  $\Delta ure2\Delta gat2$ , and *nGAT2*; in the latter, this expression was the same as in  $\Delta ure2$ , whereas deletion of *GAT2* led to higher levels of expression (Fig. 7). Furthermore, overexpression of *PMR1* by increasing gene dosage reproduces  $\Delta ure2$  phenotypes (Fig. 16). We concluded that *Ure2* is involved in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis via *Gat2*, which is responsible for *PMR1* regulation.

*Gat2* Levels Are Regulated by Calcineurin and *Gat1*—Because *Gat2* plays a key role downstream from *Ure2*, we determined *Gat2* levels in  $\Delta cnb1$  and  $\Delta ure2$ .  $\Delta cnb1$  showed very low levels of *Gat2*, almost undetectable by Western blot, whereas in

## Role of HpUre2 in Nitrogen-Gene Expression and Salt Tolerance

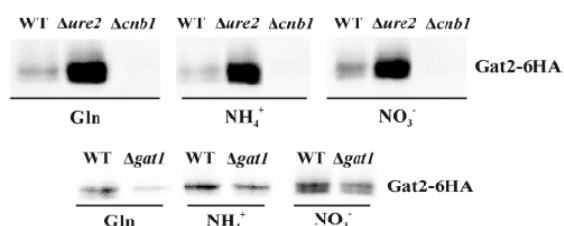


FIGURE 17. *CNB1* and *GAT1* deletion decreases *Gat2* levels, whereas *URE2* deletion increases them. *Gat2*-6HA levels in WT,  $\Delta ure2$ ,  $\Delta cnb1$ , and  $\Delta gat1$  were analyzed by SDS-PAGE. Cells grown to early exponential phase in synthetic medium plus 5 mM ammonium were washed and incubated for 120 min in synthetic medium plus 5 mM glutamine (Gln), 5 mM ammonium ( $NH_4^+$ ), or 5 mM nitrate ( $NO_3^-$ ). 50  $\mu$ g of protein were analyzed.

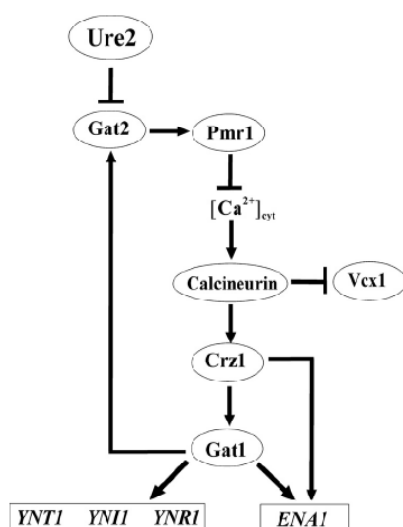


FIGURE 18. Working model for role of *Ure2* in  $Ca^{2+}$  homeostasis, nitrate assimilation, and *ENA1* gene expression. *Ure2* regulates  $Ca^{2+}$  cell content via *Gat2*, which acts transcriptionally on *PMR1*. *Pmr1* regulates  $Ca^{2+}$  levels in ER-Golgi, which in turn act on total  $Ca^{2+}$  content in the cell, modulating calcineurin activation. This induces *ENA1* and nitrate assimilation gene up-regulation via *Crz1* → *Gat1*. *ENA1* is also induced via *Crz1* directly. *Gat2* is transcriptionally activated by *Gat1*. Lines with arrowheads indicate positive events, whereas lines with bars are inhibitory. Although not shown here, the model assumes that *Ure2* also retains *Gat1* in the cytosol in the presence of preferred nitrogen sources.

$\Delta ure2$  they were higher than WT (Fig. 17). Because *Gat1* levels were lower in  $\Delta cnb1$  than WT, we studied whether *Gat2* was under the control of *Gat1*. Indeed in  $\Delta gat1$ , *Gat2* levels were about 50% of those in WT (Fig. 17). The high levels of *Gat2* in  $\Delta ure2$  are consistent with our results because we report that *PMR1* expression, which is regulated by *GAT2*, is higher in this strain. These high GATA factor levels are apparently contradictory with the down-regulation of calcineurin in  $\Delta ure2$ . However, because *Ure2* is absent, *Gat1* can enter the nucleus freely to activate *GAT2* transcription. The results here reported are summarized in the HpUre2 working model (Fig. 18).

## DISCUSSION

ScUre2 plays a central role in the regulation of nitrogen metabolism (1, 11, 35, 52) and to a lesser extent in salt tolerance

(12, 13, 37). *HpURE2* has been shown to be a highly pleiotropic gene because its deletion resulted in an assortment of different phenotypes. Some of the observable characteristics of *Ure2* are (i) rapamycin sensitivity; (ii) decreased tolerance to  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mn^{2+}$ , and SDS; (iii) pronounced FK506 sensitivity; and (iv) reduction of nitrate assimilation gene expression (Figs. 1, 2, 5, and 6 and Table 2). These traits reveal similarities but also important differences between ScUre2 and HpUre2. The main structural difference between them is the absence of the Q/N-rich N-terminal region involved in prion-like behavior (54, 55). We have not yet investigated whether HpUre2 presents such behavior, either in *H. polymorpha* itself or using *S. cerevisiae* as the host. However, analysis of *Ure2* revealed a clear involvement of HpUre2 in NCR (Tables 1 and 2), which suggests that the above N-terminal region seems uninvolved in NCR. This is consistent with what was found in *S. cerevisiae* (55). Although new insights into NCR suggest this prion domain contributes to *Ure2* stability and functioning in this process. Actually, this domain is required for interaction with the GATA factor *Gzf3* (56).

Besides HpUre2, we have also identified two positively acting GATA factors (*HpGat1* and *HpGat2* (see supplemental material)) and one with a negative role (*HpGzf3*), all showing significant identity with the *S. cerevisiae* GATA factors.<sup>6</sup> Altogether, these findings indicate that the overall nitrogen regulatory system in the nitrate-assimilating yeast *H. polymorpha* is closer to *S. cerevisiae* than to the filamentous fungi *A. nidulans* and *N. crassa*, which are also able to use nitrate as the sole nitrogen source (57, 58). We also found that HpUre2 undergoes phosphorylation in response to preferred nitrogen sources and is dephosphorylated under nitrogen limitation conditions and by rapamycin (Fig. 1). This confirms our previous observation that in *H. polymorpha*, the TOR signaling pathway responds to nitrogen sources and regulates nitrogen assimilation gene expression (59). The phosphorylation state of *Ure2* could play an important role in modulating its interaction with the GATA factors.

Another remarkable difference between HpUre2 and ScUre2 is their role in the response to  $Na^+$  and  $Li^+$  stress; whereas *HpUre2* presents sensitivity to these cations (Fig. 2), *ScUre2* is resistant. Greater  $Li^+$  accumulation and low *ENA1* expression account for the  $Na^+/Li^+$  sensitivity of *HpUre2* (Figs. 3 and 4). As occurs in *S. cerevisiae*, both calcineurin and *Gat1* regulate *ENA1* positively because strains lacking *Gat1* (supplemental Fig. S4) and *Cnb1* (data not shown) showed low levels of *ENA1* expression. Two new findings open novel perspectives on this interesting protein. First, *Ure2* clearly regulates  $Ca^{2+}$  cell content via *Gat2*, which acts transcriptionally on *PMR1* (Fig. 15). Second, this process is involved in activating the calcineurin pathway. Even more important, *Gat1* levels were clearly regulated by calcineurin (Fig. 12). Indeed, because it is widely assumed that  $Ca^{2+}$  activates calcineurin in response to different stimuli (60, 61), a poor activation of calcineurin was to be expected in  $\Delta ure2$ . Accordingly, a strong parallelism in the behavior of  $\Delta cnb1$  and  $\Delta ure2$  was seen: (i) the two strains were

<sup>6</sup> B. Medina and J. M. Siverio, unpublished results.

## Role of HpUre2 in Nitrogen-Gene Expression and Salt Tolerance

sensitive to  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ , and SDS; (ii)  $\Delta ure2\Delta cnb1$  showed a phenotype very close to  $\Delta cnb1$  (Fig. 6); (iii) *ENA1* expression levels were identically low in both strains (data not shown); (iv) *Gat1* levels were very low in both (Fig. 12); (v)  $\Delta ure2$  was remarkably sensitive to FK506 (Fig. 5); and (vi) the lower calcineurin activation in  $\Delta ure2$  was shown using *4xCDRE-lacZ* (Fig. 7). The slight increase in  $\Delta cnb1\Delta ure2$  sensitivity with respect to  $\Delta cnb1$  could be due to the role of *Ure2* in detoxification processes (15). These findings allow us to understand the scarce induction of *ENA1* in  $\Delta ure2$  in response to  $Na^+/Li^+$ . We are also aware that regulation of *Gat1* by calcineurin has a special significance for nitrate assimilation gene derepression in *H. polymorpha*. We emphasize that our results allow us to conclude that NCR is almost abolished in  $\Delta ure2$ . In this regard, *HpUre2* seems to operate as in *S. cerevisiae*, retaining GATA factors outside the nucleus when the medium contains preferred nitrogen sources (1, 7–9). However, in  $\Delta ure2$ , nitrate assimilation gene derepression in nitrate is negatively affected. Now we know that this is due to the low levels of *Gat1* present in  $\Delta ure2$ .

Expression of *ScURE2* in  $Hp\Delta ure2$  also revealed that *HpUre2* displays a more complex regulatory network than *ScUre2*. Thus, *ScUre2* rescued  $Cd^{2+}$  tolerance (Fig. 13) and NCR in  $Hp\Delta ure2$  (Fig. 13 and supplemental Table IV). This rescue is associated with the GST and GPx activities of *ScUre2*, respectively, and its capacity to retain *HpGat1* outside the nucleus in the presence of preferred nitrogen sources, such as ammonium. In contrast,  $Li^+$  tolerance and NR activity were not complemented, indicating the incapacity of *ScURE2* to activate the calcineurin in  $Hp\Delta ure2$  (Fig. 13 and supplemental Table IV). These results are consistent with our model of the action mechanisms of *HpUre2* (i.e. its capacity to interact directly with *Gat1* but also indirectly acting on its levels via  $Ca^{2+}$  homeostasis and calcineurin). Moreover, *ScURE2* expressed in *H. polymorpha* seems to interact only with *HpGat1*, whereas *HpUre2* interacts with *HpGat1* and *HpGat2*, which is involved in *PMR1* up-regulation to maintain  $Ca^{2+}$  homeostasis (Fig. 15).

Calcineurin has been widely reported to be associated with GATA factors in mammalian cells, playing an important role in muscle regeneration and hypertrophy in association with NFATc1 and GATA-2 (62, 63). Blockage of calcineurin down-regulates GATA-6-DNA binding in differentiated vascular smooth muscle cells (64). The hypertrophic effects of calcineurin in cardiomyocytes have been linked with its interaction with GATA-4 transcription factor (65).

Regarding lower levels of  $Ca^{2+}$  in  $\Delta ure2$  than in WT, we observed that a lack of *Ure2* led to  $Ca^{2+}$ -ATPase *PMR1* gene up-regulation (Fig. 15), presumably as a consequence of a GATA factor being freed from *Ure2* and entering the nucleus. Once the GATA factor is in the nucleus, it can act directly on *PMR1* or on a second GATA factor affecting *PMR1*. We therefore propose that *PMR1* is regulated by *Ure2* through *Gat2* in *H. polymorpha*, because (i) *GAT2* deletion led to *PMR1* down-regulation (Fig. 15), (ii) its overexpression led to *PMR1* up-regulation (Fig. 15), and (iii)  $\Delta ure2$  presents high levels of *Gat2* (Fig. 17). Because *GAT2* is down-regulated in  $\Delta gat1$  and  $\Delta cnb1$  (Fig. 17), activation of *GAT2* expression by *Gat1* cannot be ruled out. In *S. cerevisiae*, the ER-Golgi  $Ca^{2+}$  store has been

shown to induce a signal that modulates extracellular  $Ca^{2+}$  entry (49–51), depending in turn on  $Ca^{2+}$ -ATPase *Pmr1* levels. We consider that the up-regulation of *PMR1* via *Gat2* in  $\Delta ure2$  leads to a decrease in  $Ca^{2+}$  entry, resulting in a reduced cytosolic  $Ca^{2+}$  store. Deletion of *GAT2* from the  $\Delta ure2$  genetic background abolished *PMR1* up-regulation (Fig. 15), and in accordance with our hypothesis,  $Ca^{2+}$  content was restored to WT levels (Fig. 10). Furthermore, the activation of *Vcx1* in  $\Delta ure2$  could also act concertedly or sequentially along with *PMR1* to reduce the cytoplasmic  $Ca^{2+}$  available for calcineurin activation.

The *Pmr1*  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$ -ATPase negatively regulates the rapamycin-sensitive TOR complex (TORC1) in *S. cerevisiae*,  $Mn^{2+}$  in the Golgi being involved in TORC1 signaling inhibition (66). However, our results are consistent with the role of *Pmr1* in  $Ca^{2+}$  transport. In agreement with this,  $Ca^{2+}$  addition produced a lower *ENA1-lacZ* induction in  $\Delta ure2$  than in WT (Fig. 9), as would be expected for a strain where  $Ca^{2+}$  homeostasis is jeopardized.

We have elucidated the mechanisms underlying  $Ca^{2+}$  homeostasis,  $Na^+/Li^+$  tolerance, and nitrate assimilation gene derepression involving *Ure2* in *H. polymorpha*, which provide new insights into the role of this protein. Whether or not the same mechanisms exist in other yeasts is an intriguing question. So far, how *Ure2* acts in nitrogen regulation and facilitates  $Na^+/Li^+$  tolerance has only been characterized in *S. cerevisiae*. Indeed, the function of *ScUre2* in NCR is fully complemented by the *Ure2p* of different *Candida* and *Saccharomyces* yeast species (53). In contrast, we report here that *ScURE2* expressed in  $Hp\Delta ure2$  complements NCR but not those phenotypes where calcineurin is involved, suggesting that the mechanisms so far elucidated for *ScUre2* are not universal.

In summary, we uncover the central role of *Ure2* in  $Ca^{2+}$  homeostasis and its implication in calcineurin pathway activation. The GATA factor *Gat1* is also shown to be regulated by calcineurin.

*Acknowledgments*—Access to the *H. polymorpha* genome database provided by Rhein Biotech GmbH (Duesseldorf, Germany) is gratefully acknowledged. We are very thankful to C. Gancedo (IIB, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) for comments on the manuscript, F. Navarro (Rockefeller University) for invaluable assistance during the course of this work, L. Galindo and M. Germán (Universidad de La Laguna) for  $Ca^{2+}$  determination, and G. Jones for proofreading the manuscript.

## REFERENCES

- Cooper, T. G. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 223–238
- Drillien, R., Aigle, M., and Lacroute, F. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 367–372
- Drillien, R., and Lacroute, F. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 203–208
- Aigle, M., and Lacroute, F. (1975) *Mol. Gen. Genet.* 136, 327–335
- Lacroute, F. (1971) *J. Bacteriol.* 106, 519–522
- Wickner, R. B. (1994) *Science* 264, 566–569
- Beck, T., and Hall, M. N. (1999) *Nature* 402, 689–692
- Cox, K. H., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J. R., Coffman, J. A., and Cooper, T. G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 17611–17618
- Kulkarni, A. A., Abul-Hamad, A. T., Rai, R., El Berry, H., and Cooper, T. G. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 32136–32144

**Role of HpUre2 in Nitrogen-Genes Expression and Salt Tolerance**

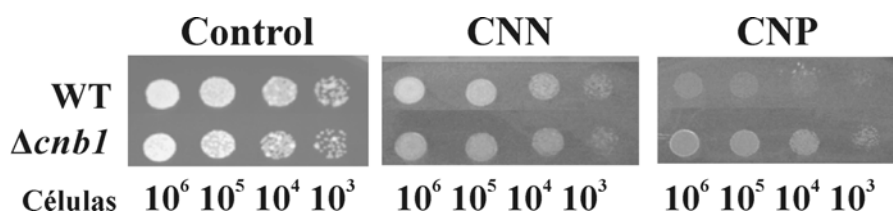
10. Georis, I., Tate, J. J., Cooper, T. G., and Dubois, E. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 8919–8929
11. Shamji, A. F., Kuruville, F. G., and Schreiber, S. L. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 1574–1581
12. Crespo, J. L., Daicho, K., Ushimaru, T., and Hall, M. N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34441–34444
13. Withee, J. L., Sen, R., and Cyert, M. S. (1998) *Genetics* **149**, 865–878
14. Coschigano, P. W., and Magasanik, B. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 822–832
15. Rai, R., Tate, J. J., and Cooper, T. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12826–12833
16. Bai, M., Zhou, J. M., and Perrett, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50025–50030
17. Navarro, F. J., Machín, F., Martín, Y., and Siverio, J. M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 13268–13274
18. Navarro, F. J., Martín, Y., and Siverio, J. M. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 31208–31217
19. Pérez, M. D., González, C., Avila, J., Brito, N., and Siverio, J. M. (1997) *Biochem. J.* **321**, 397–403
20. Siverio, J. M. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 277–284
21. Pan, H., Feng, B., and Marzluf, G. A. (1997) *Mol. Microbiol.* **26**, 721–729
22. Xiao, X., Fu, Y. H., and Marzluf, G. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 8861–8868
23. Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A., and Hynes, M. J. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1973–1977
24. Fraser, J. A., Davis, M. A., and Hynes, M. J. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2802–2808
25. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 6.31–6.32; 2.106–2.108, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
26. Pfaffl, M. W. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, e45
27. Brito, N., Pérez, M. D., Perdomo, G., González, C., García-Lugo, P., and Siverio, J. M. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 26–29
28. Leao-Helder, A. N., Krikken, A. M., van der Klei, I. J., Kiel, J. A., and Veenhuis, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 40749–40756
29. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999) *Yeast* **15**, 963–972
30. Ramos, J., Haro, R., and Rodríguez-Navarro, A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1029**, 211–217
31. Faber, K. N., Haima, P., Harder, W., Veenhuis, M., and AB, G. (1994) *Curr. Genet.* **25**, 305–310
32. Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3328–3337
33. Souciet, J., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., de Montigny, J., Dujon, B., Durrens, P., Gaillardin, C., Lépingle, A., Llorente, B., Malpertuy, A., Neuvéglise, C., Ozier-Kalogéropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekkaia, F., Toffano-Nioche, C., Wésolowski-Louvel, M., Wincker, P., and Weissenbach, J. (2000) *FEBS Lett.* **487**, 3–12
34. Avila, J., Pérez, M. D., Brito, N., González, C., and Siverio, J. M. (1995) *FEBS Lett.* **366**, 137–142
35. Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J., and Heitman, J. (1999) *Genes Dev.* **13**, 3271–3279
36. Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., and Pardo, J. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8792–8796
37. Ruiz, A., and Ariño, J. (2007) *Eukaryot. Cell* **6**, 2175–2183
38. Heitman, J., Cardenas, M. E., Breuder, T., Hemenway, C., Muir, R. S., Lim, E., Goetz, L., Zhu, D., Lorenz, M., and Dolinski, K. (1994) *Transplant Proc.* **26**, 2833–2834
39. Jiang, B., and Cyert, M. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18543–18551
40. Cunningham, K. W., and Fink, G. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2226–2237
41. Coffman, J. A., Rai, R., Cunningham, T., Svetlov, V., and Cooper, T. G. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 847–858
42. Coffman, J. A., Rai, R., Loprete, D. M., Cunningham, T., Svetlov, V., and Cooper, T. G. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 3416–3429
43. Georis, I., Feller, A., Vierendeels, F., and Dubois, E. (2009) *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3803–3815
44. Rowen, D. W., Esiobu, N., and Magasanik, B. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 3761–3766
45. Stathopoulos, A. M., and Cyert, M. S. (1997) *Genes Dev.* **11**, 3432–3444
46. Aberg, B. (1947) *Kungl. Lantbrukshögskolans Ann.* **15**, 37–107
47. Antebi, A., and Fink, G. R. (1992) *Mol. Biol. Cell* **3**, 633–654
48. Cunningham, K. W., and Fink, G. R. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 351–363
49. Kellermayer, R., Aiello, D. P., Miseta, A., and Bedwell, D. M. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1637–1646
50. Halachmi, D., and Eilam, Y. (1996) *FEBS Lett.* **392**, 194–200
51. Park, S. Y., Seo, S. B., Lee, S. J., Na, J. G., and Kim, Y. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28694–28699
52. Crespo, J. L., and Hall, M. N. (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 579–591
53. Baudin-Baillieu, A., Fernandez-Bellot, E., Reine, F., Coissac, E., and Cullin, C. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3449–3458
54. Masison, D. C., and Wickner, R. B. (1995) *Science* **270**, 93–95
55. Masison, D. C., Maddelein, M. L., and Wickner, R. B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12503–12508
56. Shewmaker, F., Mull, L., Nakayashiki, T., Masison, D. C., and Wickner, R. B. (2007) *Genetics* **176**, 1557–1565
57. Marzluf, G. A. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 17–32
58. Wong, K. H., Hynes, M. J., and Davis, M. A. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 917–925
59. Navarro, F. J., Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machín, F., Guillén, R. M., Lancha, A., and Siverio, J. M. (2003) *FEMS Yeast Res.* **4**, 149–155
60. Ariño, J., Ramos, J., and Sychrová, H. (2010) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 95–120
61. Stie, J., and Fox, D. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 177–186
62. Musarò, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N., and Rosenthal, N. (1999) *Nature* **400**, 581–585
63. Sakuma, K., Nishikawa, J., Nakao, R., Watanabe, K., Totsuka, T., Nakano, H., Sano, M., and Yasuhara, M. (2003) *Acta Neuropathol.* **105**, 271–280
64. Wada, H., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kakita, T., Yanazume, T., Abe, M., and Sasayama, S. (2002) *J. Cell Biol.* **156**, 983–991
65. Wilkins, B. J., and Molkenin, J. D. (2002) *J. Physiol.* **541**, 1–8
66. Devasahayam, G., Burke, D. J., and Sturgill, T. W. (2007) *Genetics* **177**, 231–238

### 3. Papel de la calcineurina en la regulación de la asimilación de nitrógeno

En los capítulos anteriores se ha descrito la caracterización de *HpUre2* y su papel en la tolerancia a sales y en la desrepresión de los genes de asimilación de nitrato a través de la regulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  y la activación de la calcineurina. Así, *Ure2* regula la expresión de *PMR1* a través de *Gat2*. Pensamos que los niveles de  $Ca^{2+}$  en Golgi inducen una señal que modula la entrada extracelular de  $Ca^{2+}$  y consecuentemente la activación de la calcineurina que controla los niveles de *Gat1*. La regulación de *Gat1* por la vía de señalización de la calcineurina nos condujo a estudiar en profundidad la relación de la calcineurina con la RCN y con la inducción de los genes de asimilación de nitrato.

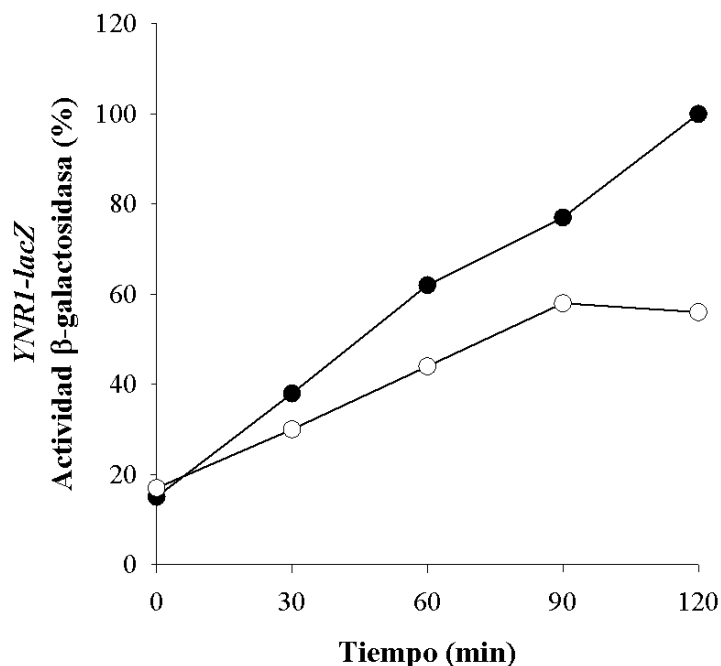
#### 3.1 La calcineurina participa en la desrepresión de los genes responsables de la asimilación de nitrato

La regulación de los factores transcripcionales *Gat1* y *Gat2* por la calcineurina nos indujo a profundizar en el estudio del papel de la calcineurina en la asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas. Para ello usamos el nitrato como referencia. Como primera aproximación, estudiamos el crecimiento de  $\Delta cnb1$  en presencia de clorato, compuesto cuya transformación a clorito, tóxico para la célula, es catalizada por la nitrato reductasa. El clorato se ha utilizado ampliamente en la búsqueda de genes involucrados en la asimilación de nitrato (Cove, 1972; Cove, 1976; Kosola y Bloom, 1996). En nitrato tanto en presencia como ausencia de amonio  $\Delta cnb1$  mostró una gran tolerancia a clorato, a diferencia del WT cuyo crecimiento se inhibe en ausencia de amonio (figura 43) debido a los mayores niveles de NR.



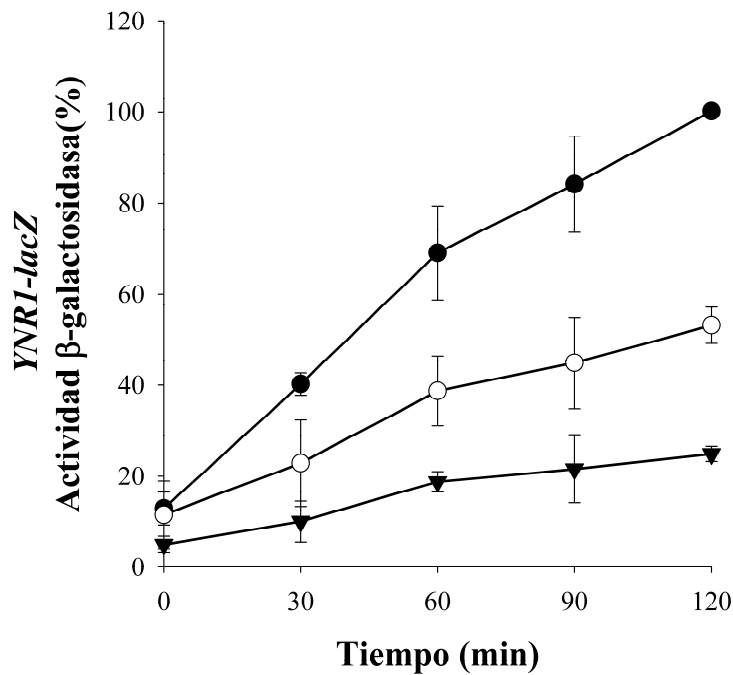
**Figura 43.  $\Delta cnb1$  es resistente a clorato.** Las cepas WT y  $\Delta cnb1$  se sembraron en placa mediante goteo en medio con KClO<sub>3</sub> 50 mM en NH<sub>4</sub>Cl 5 mM más NaNO<sub>3</sub> 1 mM (CNN) o en NaNO<sub>3</sub> 5 mM más prolina 1 mM (CNP). Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

Este resultado sugería la existencia de una baja expresión del gen *YNRI* en  $\Delta cnb1$ . De acuerdo con dicha hipótesis, al comparar la expresión del gen *YNRI* en presencia de nitrato usando cepas WT y  $\Delta cnb1$ , se observó una menor expresión del gen en  $\Delta cnb1$  (figura 44).

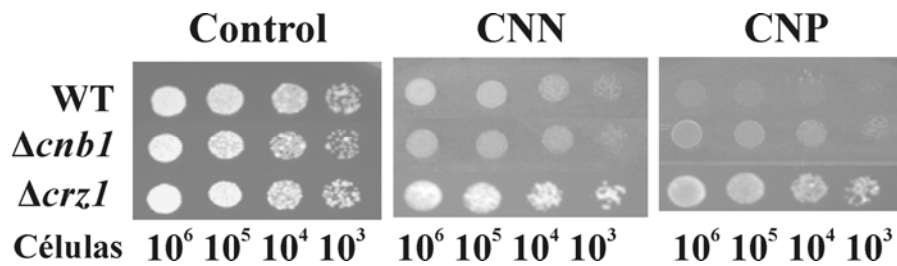


**Figura 44. Expresión de *YNRI* en  $\Delta cnb1$ .** La expresión de *YNRI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●) y  $\Delta cnb1$  (○) que portan la construcción *YNRI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en  $\text{NaNO}_3$  5 mM durante 2 horas. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Con el fin de confirmar que la calcineurina regula la expresión génica de *YNRI* a través de la activación del factor transcripcional Crz1, se determinaron los niveles de expresión del gen *YNRI* en la cepa  $\Delta crz1$ . Efectivamente,  $\Delta crz1$  presentó niveles de expresión de *YNRI* inferiores al WT y a  $\Delta cnb1$  (figura 45). De acuerdo con este resultado,  $\Delta crz1$  mostró una mayor tolerancia a clorato que  $\Delta cnb1$  (figura 46). Por tanto, pudimos concluir que la calcineurina regula la expresión de los genes de la asimilación de nitrato vía Crz1.

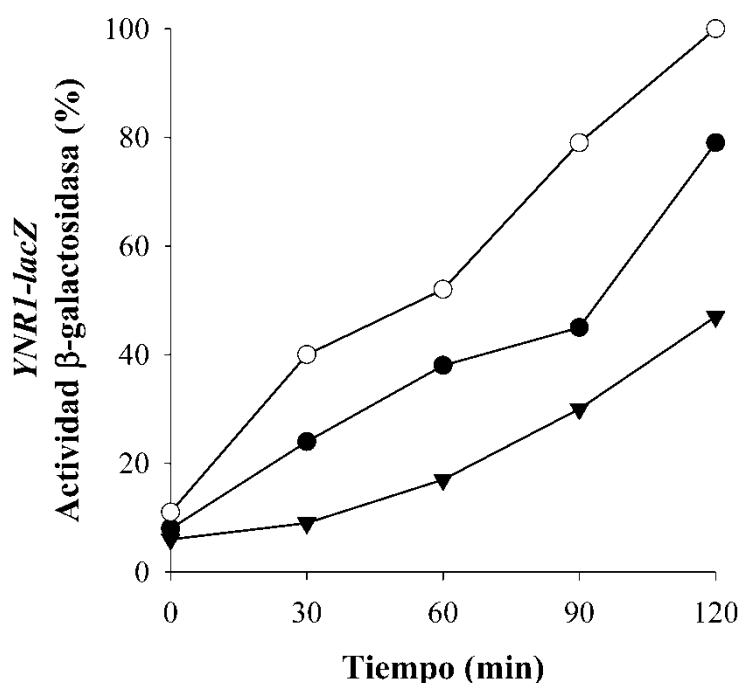


**Figura 45. Expresión de *YNR1* en  $\Delta cnb1$  y  $\Delta crz1$ .** La expresión de *YNR1* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●)  $\Delta cnb1$  (○) y  $\Delta crz1$  (▼) que portan la construcción *YNR1-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en  $\text{NaNO}_3$  5 mM durante 2 horas. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 46.  $\Delta crz1$  es resistente a clorato.** Las cepas WT,  $\Delta cnb1$  y  $\Delta crz1$  se sembraron en placa mediante goteo en medio con  $\text{KClO}_3$  50 mM en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM más  $\text{NaNO}_3$  1 mM (CNN) o en  $\text{NaNO}_3$  5 mM más prolina 1 mM (CNP). Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 días.

Puesto que el  $\text{Ca}^{2+}$  activa la calcineurina, quisimos estudiar el efecto de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  extra así como de la depleción del mismo sobre la expresión de *YNRI*. Para ello, incubamos la cepa WT en presencia de nitrato más  $\text{Ca}^{2+}$  o nitrato más EGTA, agente quelante del  $\text{Ca}^{2+}$ , durante 2 horas. Como se esperaba, el  $\text{Ca}^{2+}$  actuó como coadyuvante en la expresión de *YNRI* mientras que el agente quelante EGTA bloqueó en parte su expresión (figura 47).

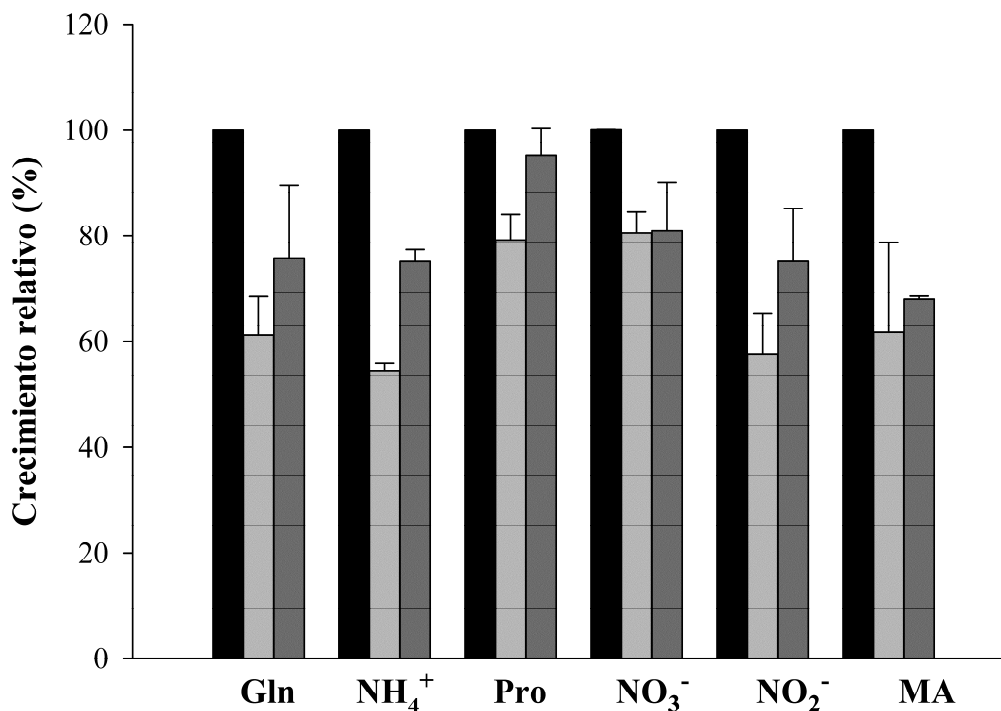


**Figura 47. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y el EGTA sobre la expresión de *YNRI*.** La expresión de *YNRI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en una cepa WT portadora de la construcción *YNRI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en  $\text{NaNO}_3$  5 mM (●) con  $\text{CaCl}_2$  50 mM (○) o con EGTA 20 mM (▼) durante 2 horas. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

Esta observación junto con la regulación de los niveles de los factores GATA, Gat1 y Gat2 por parte de la calcineurina, sugería que la calcineurina participa en la señal de desrepresión de los genes involucrados en la asimilación de nitrato. Sin embargo, como se comentó en el apartado 6 de la introducción la señal de desrepresión tiene un carácter general, es decir, no sólo desreprime la expresión de los genes necesarios para



la asimilación de nitrato sino también desreprime los genes responsables de la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno. Por ello, estudiamos el patrón de crecimiento de  $\Delta cnb1$  y  $\Delta crz1$  en medios con distintas fuentes alternativas. Ambas cepas mostraron un crecimiento menor en nitrato, nitrito, prolina y metilamonio respecto a la cepa WT. Sorprendentemente, también en fuentes de nitrógeno preferidas como amonio y glutamina, las cepas carentes de calcineurina y Crz1 mostraron un crecimiento deficiente (figura 48).



**Figura 48. Crecimiento de  $\Delta cnb1$  y  $\Delta crz1$  en diferentes fuentes de nitrógeno.** Los cultivos se iniciaron a una  $DO_{660}$  de 0.2 en medio con glutamina 5 mM (Gln), amonio 5 mM ( $NH_4^+$ ), prolina 1 mM (Pro), nitrato 1 mM ( $NO_3^-$ ) nitrito 1 mM ( $NO_2^-$ ) o metilamonio 5 mM (MA) y se incubaron durante 18 horas. Los datos muestran el valor medio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes expresado en porcentaje. El porcentaje de crecimiento se calculó fijando como 100% la DO alcanzada por el WT en todos los medios. WT (izquierda);  $\Delta cnb1$  (centro);  $\Delta crz1$  (derecha).

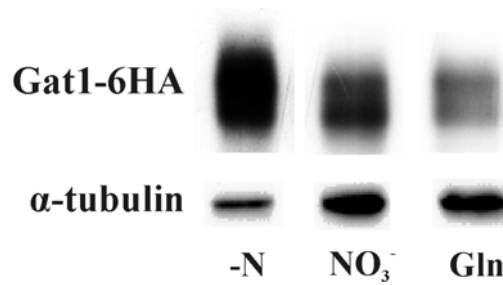
Por tanto, se observa que la calcineurina regula la asimilación tanto de fuentes preferentes como no preferentes de nitrógeno. El menor crecimiento en amonio y glutamina podría ser consecuencia de la desregulación de la permeasa general de aminoácidos Gap1 o los sistemas de transporte de amonio Mep (Boeckstaens *et al.*,

2007; Feller *et al.*, 2006). En *S. cerevisiae* la expresión de *GAP1* y *MEP2* es dependiente de Gln3 y/o Gat1. Los bajos niveles de Gat1 y Gat2 en  $\Delta cnb1$  son consistentes con esta hipótesis. Además en *S. cerevisiae*, *MEP1* ha sido definido como uno de los 163 genes dependientes de calcineurina siendo 2.9 veces mayor su expresión tras la adición de 200 mM de  $\text{CaCl}_2$  en ausencia de FK506 que en presencia del macrólido. El menor crecimiento en nitrato y nitrito podría deberse a la menor expresión de *YNT1*.

### **3.2 La calidad de las fuentes nitrogenadas regula la activación de la calcineurina**

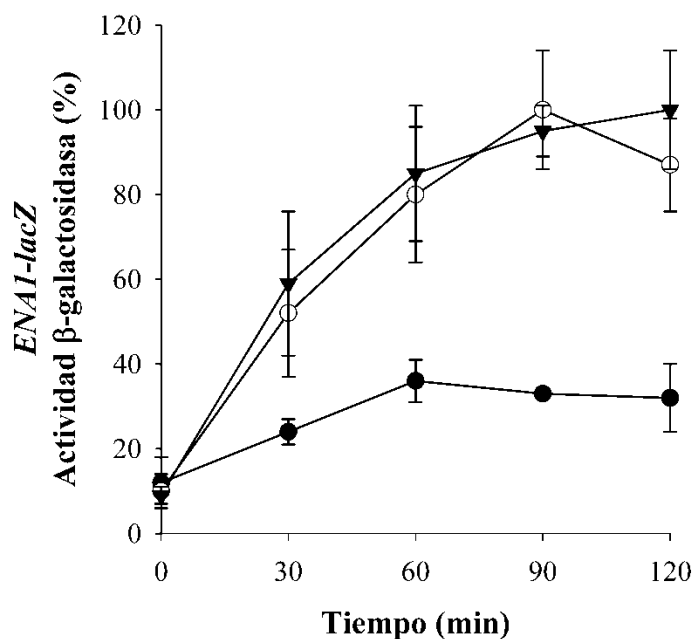
La ausencia de calcineurina parecía afectar a la asimilación de diversas fuentes nitrogenadas. En este punto, nos preguntamos si las fuentes nitrogenadas tendrían efecto sobre la activación de la calcineurina. Para contestar a esa pregunta decidimos estudiar los niveles de expresión de dos genes cuya regulación es dependiente de calcineurina como una medida indirecta del nivel de activación de la calcineurina. *GATI*, cuyos niveles dependen directamente de la calcineurina (vía Crz1) y *ENAI*, cuya expresión depende a su vez de Gat1. En primer lugar, analizamos los niveles de Gat1 en una cepa silvestre incubada en glutamina, nitrato y en ausencia de nitrógeno. Los niveles de Gat1 fueron mayores en presencia de nitrato o en ausencia de nitrógeno (-N) que en glutamina (figura 49). Por tanto, los niveles de Gat1 dependen de la fuente nitrogenada incrementándose en presencia de fuentes pobres. Este resultado sugiere que la activación de la calcineurina podría estar regulada por la calidad de la fuente de nitrógeno.

Dados los resultados obtenidos respecto a Gat1, decidimos analizar el efecto de las fuentes de nitrógeno sobre la expresión de *ENAI*, gen que tal como se describió con anterioridad está regulado por la calcineurina (figura 17).



**Figura 49. La fuente nitrogenada regula los niveles de Gat1.** Los niveles de Gat1-6HA se analizaron mediante SDS-PAGE en la cepa WT. Las células crecidas en NH<sub>4</sub>Cl hasta la fase exponencial, se lavaron e incubaron durante 2 h en ausencia de nitrógeno (-N), en NaNO<sub>3</sub> 5 mM o en glutamina 5 mM. Se analizaron 10 µg de proteína.

Tanto la incubación en presencia de nitrato como el ayuno de nitrógeno causaron un incremento en la inducción de *ENAI* en respuesta a Na<sup>+</sup> respecto a amonio (figura 50). Estos resultados indicaban que la calcineurina es activada por fuentes no preferentes de nitrógeno. Sin embargo, puesto que la expresión de *ENAI* está modulada positivamente por Gat1 y Gat1 responde a la calidad de la fuente nitrogenada, se podría argumentar que la inducción de *ENAI* en respuesta a nitrato o ayuno de nitrógeno está mediada exclusivamente por Gat1, es decir, de forma independiente a la calcineurina. Para descartar esta posibilidad llevamos a cabo el mismo experimento con la cepa  $\Delta cnb1$ , es decir, comparamos la expresión de *ENAI* en respuesta a Na<sup>+</sup> en amonio, nitrato o ayuno de nitrógeno. En este caso no se observó cambios en la expresión de *ENAI*. Las evidencias obtenidas respecto a Gat1 y *ENAI* sugieren que la calidad de la fuente nitrogenada modula la activación de la calcineurina. De acuerdo con este resultado, en *S. pombe* la expresión de la subunidad catalítica de la calcineurina, denotada como *ppb1*<sup>+</sup>, es inducida en condiciones de ayuno de nitrógeno, condición que favorece el apareamiento en *S. pombe* (Plochocka-Zulinska *et al.*, 1995). En relación a la activación de la calcineurina por un nutriente, en *S. cerevisiae*, se ha visto que la adición de glucosa, en presencia de Ca<sup>2+</sup>, en células desreprimidas produce una rápida y transitoria entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio extracelular que provoca finalmente la activación de Crz1 vía calcineurina (Groppi *et al.*, 2011).



**Figura 50. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *ENAI*.** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa WT portadora de la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en presencia de NaCl 0,7 M en NH<sub>4</sub>Cl 5 mM (●), en NaNO<sub>3</sub> 5 mM (○) o en ausencia de nitrógeno (▼) durante 120 min. Se representan los valores medios de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

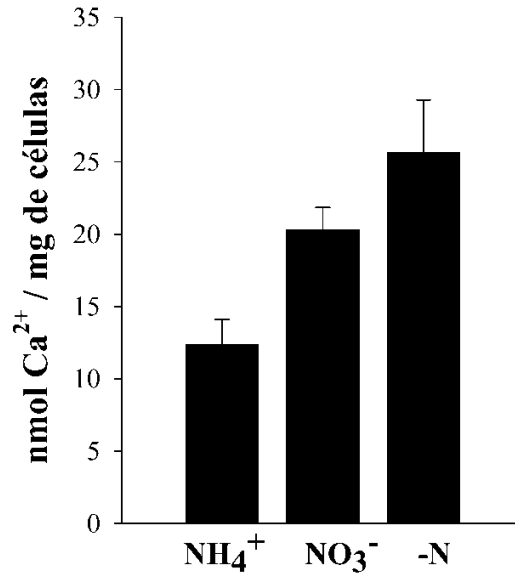
### 3.3 El Ca<sup>2+</sup> podría actuar como segundo mensajero en la transducción de señal de la calidad de la fuente nitrogenada

Se sabe que la activación de la vía de la calcineurina depende de cambios en la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup> que actúa como señalizador o segundo mensajero en una gran variedad de procesos fisiológicos en todos los organismos eucariotas. En levaduras, los cambios en las concentraciones citosólicas de Ca<sup>2+</sup> participan en el control del ciclo celular (Hartley *et al.*, 1996; Iida *et al.*, 1990a), en la salida de la detención de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> tras la limitación de carbono (Eilam y Othman, 1990; Eilam *et al.*, 1990; Kaibuchi *et al.*, 1996), en la detección de galactosa y glucosa (Tokes-Fuzesi *et al.*, 2002), el apareamiento (Nakajima-Shimada *et al.*, 1991; Withee *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2006) el procesamiento de proteínas en la vía de secreción (Durr *et al.*,

1998) y en la adaptación frente al estrés salino (Nakamura *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Batiza *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1998; Denis y Cyert, 2002).

Los resultados obtenidos nos indujeron a estudiar si las fuentes de nitrógeno podrían inducir cambios en el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . En base a nuestra hipótesis la presencia de nitrato o la ausencia de nitrógeno promoverían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular lo que produciría la activación de la calcineurina y con ello la inducción de las ATPasas responsables de la compartimentalización del  $\text{Ca}^{2+}$ . Este hecho presumiblemente nos permitiría detectar diferencias en el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en las distintas fuentes de nitrógeno. Efectivamente, tanto la incubación durante 2 horas en nitrato como en ayuno de nitrógeno provocaron un incremento en el contenido total de  $\text{Ca}^{2+}$  de las células (figura 51) siendo mayor el incremento en ausencia de nitrógeno. Este resultado indica que las fuentes de nitrógeno alternativas promueven la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  actuaría como señalizador de la presencia de fuentes de nitrógeno alternativas. Sin embargo, puesto que nuestras condiciones experimentales únicamente nos permiten determinar diferencias en el contenido total de  $\text{Ca}^{2+}$ , con el fin de confirmar nuestra hipótesis sería interesante utilizar la aequorina, un sensor luminiscente de calcio, que permite detectar los picos en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , que normalmente se producen a los pocos minutos del estímulo, mediante el uso de un luminómetro.

Estos resultados muestran por primera vez la relación directa entre la activación de la calcineurina y la calidad de la fuente de nitrógeno.

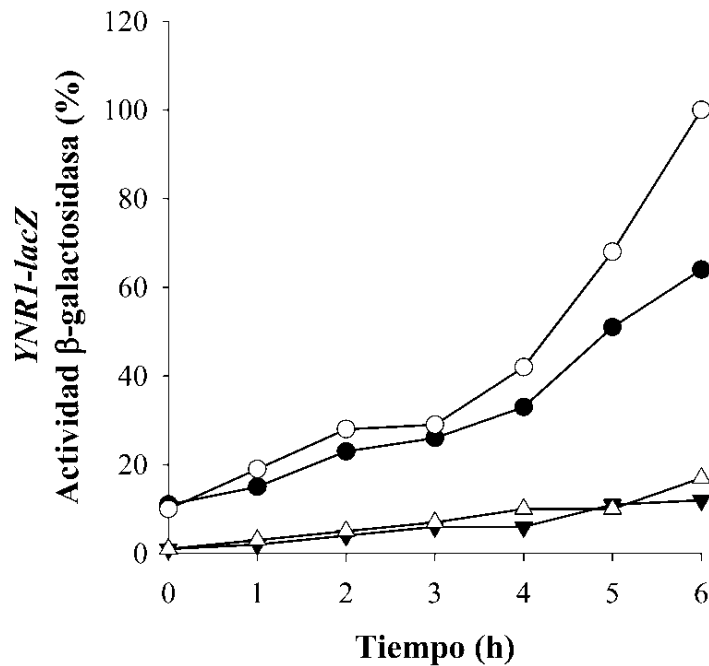


**Figura 51. Efecto de la fuente nitrogenada sobre el contenido intracelular de Ca<sup>2+</sup>.** Las células crecidas en amonio hasta una DO<sub>660</sub> de 0.3 se lavaron y se incubaron en NH<sub>4</sub>Cl 5 mM, NaNO<sub>3</sub> 5 mM o en un medio carente de nitrógeno (-N) durante 2 horas. Entonces se recogieron mediante filtración y fueron analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica. Los valores representan la media de 2 experimentos independientes, en cada uno de los cuales se realizaron 3 réplicas, ± desviación estándar.

### 3.4 La calcineurina participa en la inducción de los genes responsables de la asimilación de nitrato a través de Gat2.

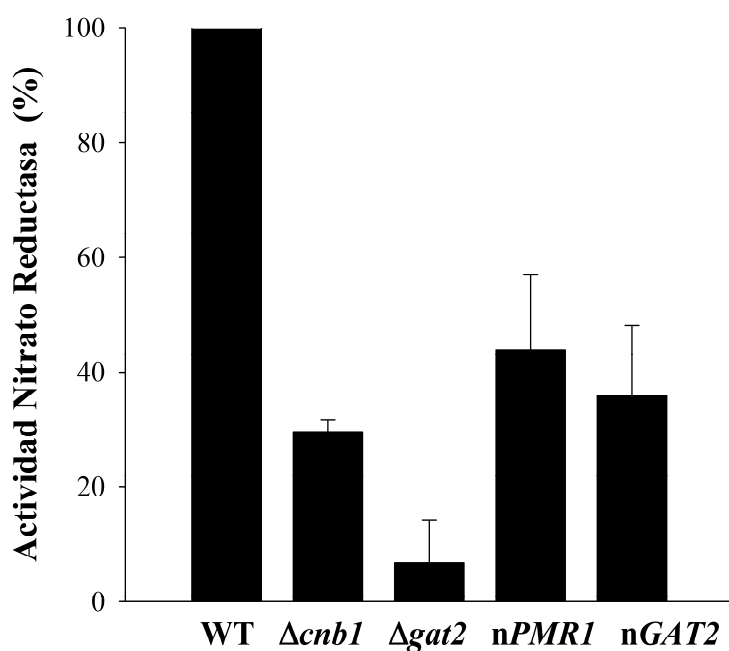
Además de la señal de desrepresión, la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato requiere la inducción generada por la presencia de nitrato una vez en el interior de la célula. Esta vía específica del nitrato está mediada por los factores transcripcionales Yna1 e Yna2 y se activa una vez que el nitrato entra en la célula. Se ha visto que al incubar la cepa  $\Delta ynr1$ , carente del gen que codifica para la enzima nitrato reductasa, portadora de la fusión *YNR1-lacZ* en un medio sin fuente de nitrógeno, la actividad  $\beta$ -galactosidasa aumenta a lo largo del tiempo, comportamiento que no se observa en una cepa que presenta actividad nitrato reductasa normal. La causa de esta desregulación de la inducción se debe a la acumulación de las trazas de nitrato en el interior celular, el cual está presente en el medio a una concentración indetectable, es transportado al interior celular por los transportadores de alta afinidad. Así la eliminación del sistema de transporte de nitrato de alta afinidad (Ynt1) bloquea el efecto de la mutación  $\Delta ynr1$  ya que las trazas de nitrato del medio no pueden ser tomadas y

acumularse en el interior celular. Por tanto el nitrato se detecta una vez ha entrado en la célula. Este mecanismo se conoce como inducción gratuita (Navarro *et al.*, 2003). Los resultados descritos hasta el momento establecen el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  y el estado de activación de la calcineurina en la desrepresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato. Sin embargo, nos preguntamos si el  $\text{Ca}^{2+}$  era capaz de reemplazar al nitrato en la inducción de los genes de la vía de asimilación de nitrato. De ser así la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  produciría el mismo efecto sobre la expresión de *YNRI* en una cepa  $\Delta ynr1$  que en una cepa  $\Delta ynr1\Delta ynt1$ , carente además del transportador de alta afinidad de  $\text{NO}_3^-$ , *Ynt1*. Al determinar el efecto de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la expresión de *YNRI* en ambas cepas en un medio sin nitrógeno se observó como el  $\text{Ca}^{2+}$  únicamente incrementó la expresión de *YNRI* en la cepa  $\Delta ynr1$  mientras que la expresión en  $\Delta ynr1\Delta ynt1$  no se vio modificada (figura 52). Este resultado indica que la entrada de nitrato es indispensable para la expresión de *YNRI* dependiente de calcineurina y confirma que son necesarias las dos señales, la de desrepresión mediada por el  $\text{Ca}^{2+}$  y la de inducción mediada por el nitrato.



**Figura 52. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la expresión de *YNRI* en las cepas  $\Delta ynr1$  e  $\Delta ynr1\Delta ynt1$ .** La expresión de *YNRI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas  $\Delta ynr1$  y  $\Delta ynr1\Delta ynt1$  portadoras de la construcción *YNRI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio. Se muestra la expresión de *YNRI* en  $\Delta ynr1$  en  $\text{NaNO}_3$  1  $\mu\text{M}$  con (○) y sin (●)  $\text{CaCl}_2$  5 mM y en  $\Delta ynr1\Delta ynt1$  en  $\text{NaNO}_3$  1  $\mu\text{M}$  con (△) y sin (▼)  $\text{CaCl}_2$  5 mM durante 6 horas. Se representan los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

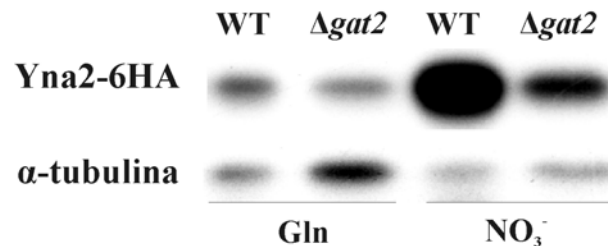
Como se estableció en el apartado 2.6, *PMR1*, que codifica la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa responsable del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo endoplasmático-Golgi, es regulado por el factor transcripcional Gat2. La sobreexpresión de *GAT2* provocó el descenso en la expresión dependiente de calcineurina que se puso de manifiesto por los bajos niveles de expresión de la construcción *4xCDRE-lacZ*. Asimismo, la cepa portadora de múltiples copias del gen *PMR1*, *nPMR1*, reprodujo los fenotipos de una cepa  $\Delta\text{cnb1}$ , como sensibilidad a  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y SDS. Estos resultados apuntan a la existencia de una baja activación de la calcineurina como consecuencia de un bajo contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en ambas cepas. Por tanto es de esperar que ambas cepas presenten bajos niveles de actividad NR. Con el fin de entender mejor la regulación positiva del  $\text{Ca}^{2+}$  y la calcineurina sobre la expresión de *YNR1* determinamos los niveles de actividad nitrato reductasa en ambas cepas, *nGAT2* y *nPMR1*. Tanto la sobreexpresión de *GAT2* como de *PMR1* provocó un descenso en la actividad nitrato reductasa en presencia de nitrato (figura 53). Por otra parte, se midió la actividad NR en una cepa mutante  $\Delta\text{gat2}$ . Esta cepa presenta una elevada expresión dependiente de calcineurina como consecuencia de los bajos niveles de expresión de *PMR1* (apartado 2.6). Por tanto, en esta cepa se esperaba observar niveles de NR superiores a la cepa silvestre. Sin embargo, al contrario de lo esperado,  $\Delta\text{gat2}$  presentó baja actividad nitrato reductasa, incluso menor a la observada en las cepas *nGAT2* y *nPMR1*.



**Figura 53. Actividad NR de las cepas  $\Delta\text{gat2}$ , *nGAT2* y *nPMR1*.** Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en medio con  $\text{NaNO}_3$  5 mM durante 2 horas. Se representan los valores medios de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

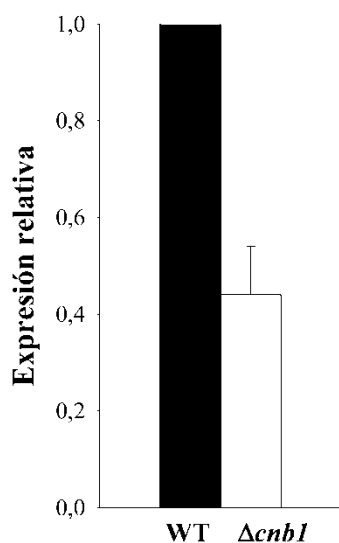


Este resultado nos hizo pensar que en ausencia de Gat2 quizá la inducción se viese afectada. De acuerdo con esta hipótesis los niveles de expresión de Yna1 e Yna2 son menores en un mutante  $\Delta gat1$  (Tejera, 2003) y como se estableció en el apartado 2.7, Gat2 está regulado positivamente por Gat1. Por ello nos preguntamos si la expresión de *YNA1* e *YNA2* estaría bajo el control de Gat2. Para ello, construimos cepas WT y  $\Delta gat2$  portadoras de la construcción *YNA1-6HA* o *YNA2-6HA* y analizamos los niveles de ambos factores mediante inmunoblot. En  $\Delta gat2$ , los niveles de Yna2 fueron menores a los observados en el WT (figura 54). Este resultado indicaba que, efectivamente, la inducción en  $\Delta gat2$  está afectada.



**Figura 54. La delección de *GAT2* disminuye los niveles de *Yna2*.** Los niveles de Yna2-6HA se analizaron mediante SDS-PAGE en células crecidas en amonio, lavadas e incubadas durante 120 min en medio con glutamina 5 mM o nitrato 1 mM. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína. La tubulina se utilizó como control de carga.

Puesto que Gat2 es regulado por la calcineurina vía Gat1, decidimos igualmente medir los niveles de Yna2 en  $\Delta cnb1$ , esperando observar también menores niveles de Yna2. En este caso medimos la expresión del gen *YNA2* mediante qRT-PCR en la cepa WT y en  $\Delta cnb1$  incubadas en nitrato. El mutante  $\Delta cnb1$  presentó un descenso del 60 % en los niveles de expresión de *YNA2* (figura 55).

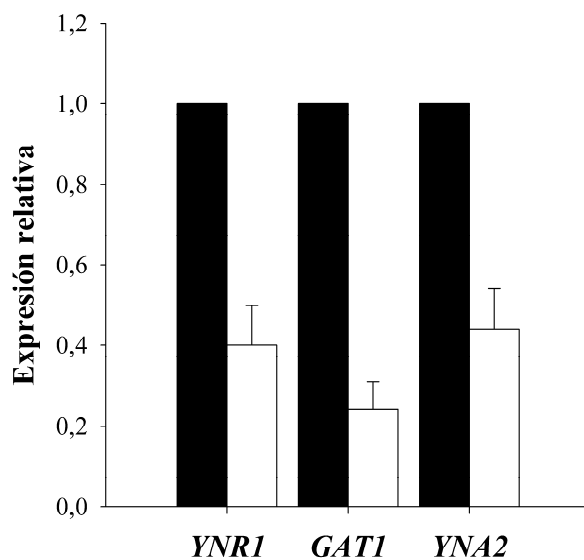


**Figura 55. Expresión de YNA2 en WT y  $\Delta cnb1$ .** Las células crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en  $\text{NaNO}_3$  5 mM durante 2 h. La expresión relativa de YNA2 se determinó mediante qRT-PCR. Los datos expresan el valor medio de expresión de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Los resultados obtenidos sugieren que la calcineurina participa tanto en la desrepresión como en la inducción de los genes de la vía de asimilación de nitrato. Así la calcineurina, activada por las fuentes de nitrógeno alternativas, induce los niveles de Gat1 vía Crz1. Gat1 induce la expresión de *GAT2* y éste a su vez la de *YNA2*. Gat1 e Yna2 están implicados en la desrepresión e inducción respectivamente de *YNRI*. Por otra parte, Gat2 induce la expresión de *PMRI* regulando negativamente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior. Este último proceso podría servir como un mecanismo de control negativo, tanto de la desrepresión como de la inducción de los genes sensibles a RCN. Pensamos que dicho mecanismo, es decir, el bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es el que opera en presencia de amonio. No debemos olvidar que el amonio es el producto final de la asimilación de nitrato.

Respecto a la necesidad de la presencia de Yna1 e Yna2 en la inducción, la sobreexpresión de cada uno de los factores *YNA1* e *YNA2* por separado es incapaz de complementar la falta del otro (Guillén, 2006). La presencia en estas proteínas de un motivo de cremallera de leucina probablemente implicado en dimerización de estos factores transcripcionales apoyaría la hipótesis de la formación de un complejo heterodimérico entre ambas proteínas similar a los formados por Dal80 y Deh1 (Svetlov y Cooper, 1998).

Finalmente, medimos también mediante la técnica de qRT-PCR la expresión de *YNRI* y *GATI*. Los resultados obtenidos con respecto a *YNRI* fueron idénticos a los observados con *YNRI-lacZ* (figuras 56 y 44). En cuanto a *GATI* si bien  $\Delta cnb1$  presentó menores niveles de expresión de *GATI*, un 25% respecto al WT, éstos fueron bastante superiores a los observados mediante inmunoblot (figura 24). Este resultado junto con el hecho de  $\Delta crz1$  presenta mayores niveles de Gat1 que  $\Delta cnb1$ , podría indicar que la ausencia de Cnb1 podría producir un incremento en la inestabilidad de Gat1 que sería finalmente degradado.

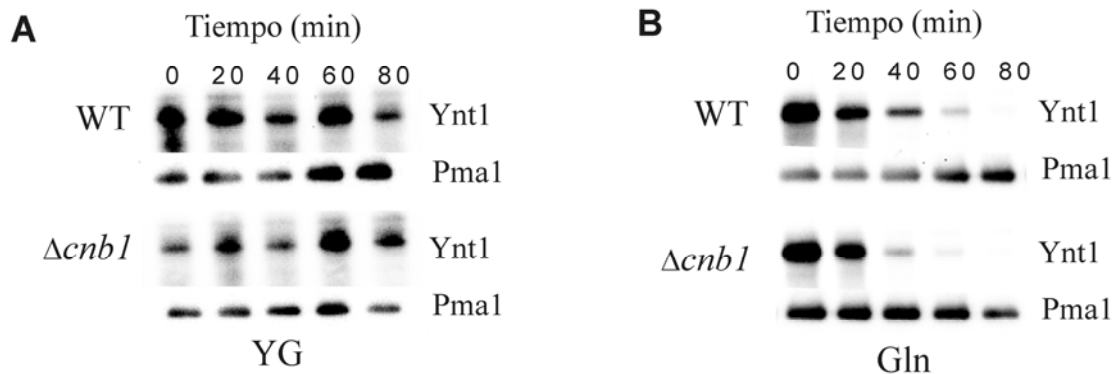


**Figura 56. Expresión de *GATI*, *YNRI* e *YNA2* en WT (negro) y  $\Delta cnb1$  (blanco).** Las células crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en  $\text{NaNO}_3$  5 mM durante 2 h. La expresión relativa de los genes se determinó mediante qRT-PCR. Los datos expresan el valor medio de expresión de 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

### 3.5 La calcineurina no participa en el tráfico intracelular de Ynt1

Nos preguntamos si la calcineurina además de participar en la regulación transcripcional de los genes de la vía de asimilación de nitrato podría tener algún efecto postraduccional. Para verificarlo, centramos nuestra atención en el transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad Ynt1. Ynt1 es regulado postraduccionalmente por la calidad de la fuente nitrogenada. En presencia de fuentes nitrogenadas preferidas Ynt1 es ubiquitinado principalmente en las Lys-253 y la Lys270. Esta modificación dispara la endocitosis de Ynt1 y su degradación vacuolar. Por el contrario, cuando las células son sometidas a ayuno de nitrógeno Ynt1 es fosforilado dirigiéndose a la membrana (Navarro *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008). La presencia de la kinasa Npr1 es esencial para la ubiquitinación y fosforilación del transportador, de tal manera que la ausencia de

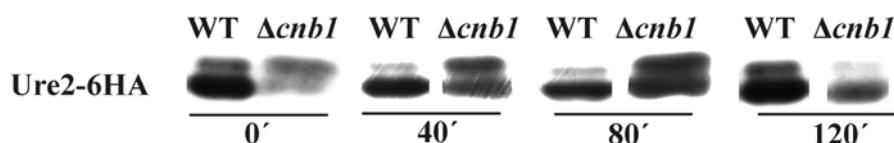
esta kinasa altera el comportamiento de Ynt1 en función de las condiciones del medio (Martín *et al.*, 2011). En este sentido, en situaciones de alta estabilidad de Ynt1 como es la ausencia de nitrógeno, la interrupción de *NPR1* desencadena la desaparición de las formas fosforiladas, con el consiguiente aumento en el tráfico Golgi-vacuola. Una situación opuesta sucede con la ubiquitinación. En el mutante  $\Delta npr1$  se incrementa considerablemente en situaciones no habituales y con ello aumenta la endocitosis del transportador. Además la sobreexpresión de esta kinasa perturba también la regulación de Ynt1. En este caso aumentando su estabilidad en situaciones en las que normalmente está defosforilado y ubiquitinado (Martín *et al.*, 2011). Al comparar los niveles de Ynt1 de una cepa WT y una cepa  $\Delta cnb1$  en presencia de glutamina y en ausencia de nitrógeno (YG) no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas (figura 57). Sin embargo, a tiempo cero existen menores niveles de Ynt1 en  $\Delta cnb1$  en YG. Este hecho sugiere que la calcineurina podría regular transcripcionalmente a *YNT1* si bien no participa en su tráfico intracelular, es decir, no está involucrada en su regulación postraduccional. Por tanto, el papel de la calcineurina en la regulación de la asimilación de nitrato podría ir más allá de la regulación de la expresión de *YNRI*, extendiéndose a *YNT1* e incluso a *YNII*.



**Figura 57. La ausencia de la calcineurina no afecta a los niveles de Ynt1.** Las células se incubaron en  $\text{NaNO}_3$  10 mM durante 2 h, se lavaron y se transfirieron a medio sin nitrógeno (YG) o con glutamina 5 mM, tomando muestras a los tiempos indicados.

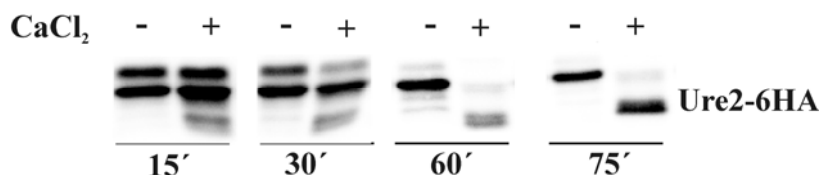
### 3.6 El Ca<sup>2+</sup> induce la completa desfosforilación de Ure2

Uno de los resultados más relevantes obtenidos durante el presente trabajo fue determinar que los niveles de Gat1 están regulados transcripcionalmente por la calcineurina. La comparación de la expresión de *GAT1*, de aproximadamente el 25%, con los niveles de proteína, casi indetectables mediante western-blot, en  $\Delta cnb1$  nos indicaba que más allá de una regulación transcripcional podría existir regulación postraduccional. Es por ello que nos preguntamos si la calcineurina podría estar implicada en la localización celular de Gat1. Para responder a esta pregunta decidimos analizar el estado de fosforilación de Ure2. En *S. cerevisiae*, en presencia de fuentes ricas de nitrógeno, Ure2 mantiene en el citoplasma al factor transcripcional Gln3 y posiblemente a Gat1 impidiendo la expresión de los genes relacionados con la asimilación de fuentes pobres. Bajo dichas condiciones Ure2 permanece fosforilado (Cooper, 2002; Beck y Hall, 1999; Cox *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2001). Recordemos que en *H. polymorpha* se observa el mismo patrón de fosforilación, es decir, en presencia de fuentes ricas de nitrógeno como glutamina Ure2 permanece fosforilado mientras que en respuesta al ayuno de nitrógeno se desfosforila (Apartado 1.1), por lo que asumimos que HpUre2, tal como ocurre en *S. cerevisiae*, retiene a Gat1 en el citoplasma en presencia de fuentes ricas y lo libera en presencia de fuentes pobres. Además puesto que la calcineurina es una fosfatasa no podíamos descartar que Ure2 fuera uno de sus sustratos. Por todo ello, estudiamos el estado de fosforilación de Ure2 en  $\Delta cnb1$  bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, observando un retraso en la desfosforilación de Ure2 respecto a la cepa silvestre (figura 58). Sin embargo, la desfosforilación tiene lugar tras 120 min de incubación lo que sugiere que si bien la vía de la calcineurina participa en su fosforilación, la calcineurina no es la fosfatasa responsable. Por tanto, otra(s) fosfatasa(s) participan en dicho proceso.



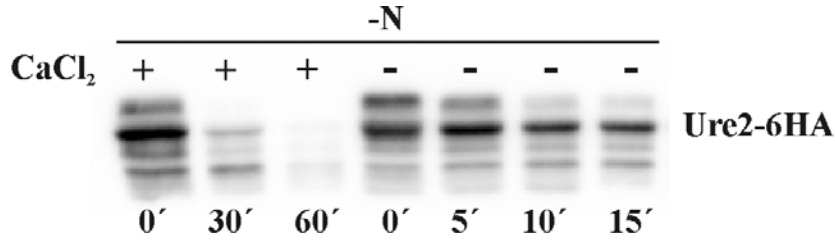
**Figura 58.** La vía de la calcineurina regula el estado de fosforilación de Ure2. Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en un medio sin nitrógeno durante 2 h.

Además de estudiar el papel de la calcineurina en la regulación postraduccional de Ure2, quisimos indagar en el posible papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de ayuno de nitrógeno. En estas condiciones, como se mostró anteriormente, aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la activación de la calcineurina y los niveles de Gat1. En este caso se analizó el patrón de fosforilación de Ure2 en una cepa WT en medio sin nitrógeno al que se añadió 50 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  esperando observar una desfosforilación más rápida. Sorprendentemente, observamos la aparición de una nueva banda de menor tamaño (figura 59).



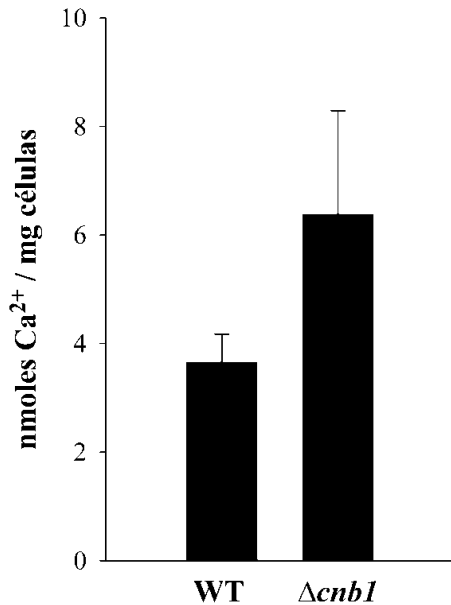
**Figura 59. El  $\text{Ca}^{2+}$  altera la movilidad electroforética de Ure2.** Las células de la cepa WT se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en un medio sin nitrógeno con y sin  $\text{CaCl}_2$  50 mM durante 75 min.

En el apartado 1.1 se analizó la migración de Ure2 en respuesta a diferentes fuentes nitrogenadas observándose dos bandas diferenciadas y una única banda tras el uso de  $\lambda$ -proteína fosfatasa. Por ese motivo, inicialmente pensamos que Ure2 podría degradarse bajo estas condiciones tan extremas. Para contrastar nuestra hipótesis, incubamos la cepa WT en medio sin nitrógeno con 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  durante 1 h, tras lo cual eliminamos el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio. Ure2 recuperó el patrón de fosforilación habitual en ayuno de nitrógeno. Además se recuperaron también los niveles de proteína por lo que pudimos descartar que se estuviese produciendo degradación de la misma (figura 60). Por tanto, el  $\text{Ca}^{2+}$  parece inducir la completa desfosforilación de Ure2. La aparición de esta nueva banda indica que el tratamiento con  $\lambda$ -proteína fosfatasa no consigue eliminar todas las formas fosforiladas de Ure2. Este hecho podría corroborarse mediante el uso de los llamados “venenos metabólicos” como la azida sódica o el fluoruro potásico, sustancias tóxicas que disminuyen la cantidad de ATP celular mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa y cadena respiratoria y el consumo de ATP celular al ser fosforilado por la hexoquinasa/glucoquinasa, respectivamente.



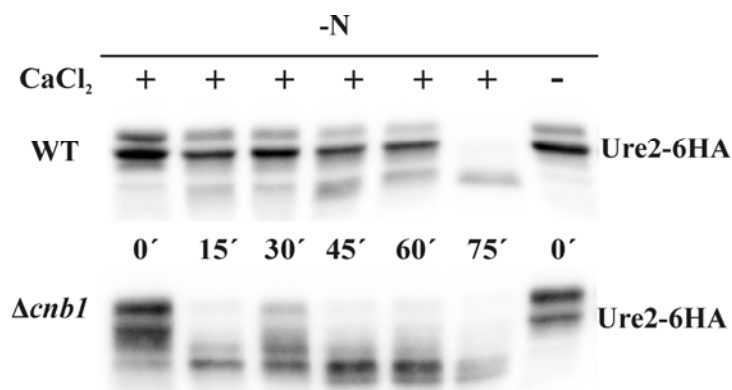
**Figura 60. El  $\text{Ca}^{2+}$  induce la completa desfosforilación de Ure2.** Las células de la cepa WT se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en un medio sin nitrógeno con  $\text{CaCl}_2$  50 mM durante 60 min, tras lo cual se lavaron varias veces y se inocularon inmediatamente en medio sin nitrógeno fresco donde permanecieron 15 min.

Con el fin de aportar otra prueba que apoyase la hipótesis de una inducción de la desfosforilación de Ure2 por parte del  $\text{Ca}^{2+}$ , decidimos medir los niveles totales de  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\Delta\text{cnbl}$ . En *S. cerevisiae*, la deleción de la calcineurina conlleva el incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  detectándose aproximadamente el doble de los niveles presentes en la cepa WT (Tanida *et al.*, 1995; Withee *et al.*, 1997). Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, la ausencia de calcineurina conlleva un incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 61).



**Figura 61. Efecto de la deleción de *CNBI* sobre el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$**  Las células crecidas en YPD se lavaron y se incubaron en amonio hasta una  $\text{DO}_{660}$  de 0.3. Entonces se recogieron mediante filtración y fueron analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica. Los valores representan la media de 2 experimentos independientes, en cada uno de los cuales se realizaron 3 réplicas,  $\pm$  desviación estándar.

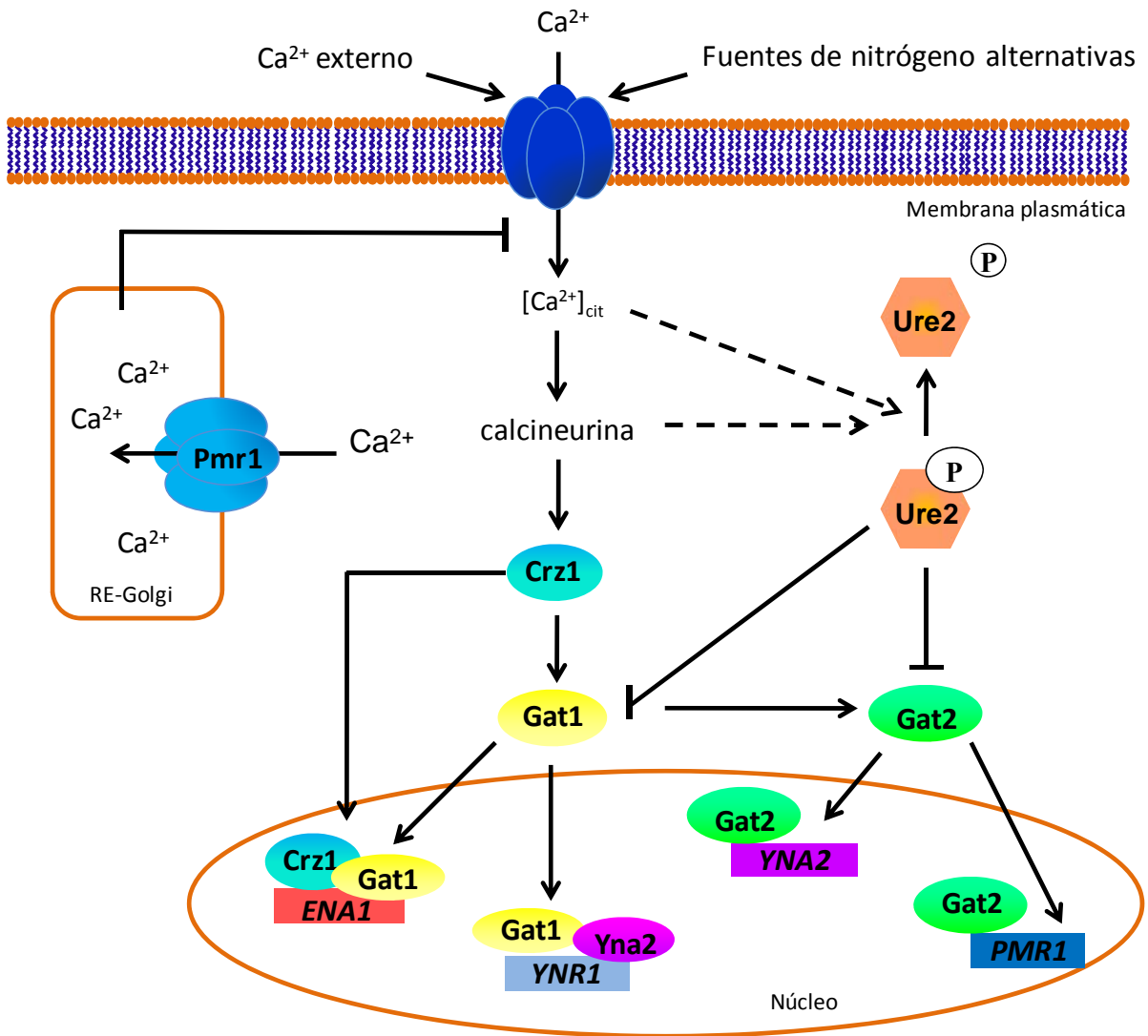
Al confirmarse los elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\Delta\text{cnb1}$ , esta cepa era una herramienta excelente para estudiar si efectivamente la desfosforilación de Ure2 tenía relación con la mayor acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Al estudiar la movilidad electroforética de Ure2 en  $\Delta\text{cnb1}$  observamos que la desfosforilación tenía lugar tan sólo tras 15 min de incubación, mucho antes que en el WT (figura 62). Asimismo la retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio hace que Ure2 recupere su patrón de fosforilación habitual en  $\Delta\text{cnb1}$  en ayuno de nitrógeno.



**Figura 62. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la movilidad electroforética de Ure2 en  $\Delta\text{cnb1}$ .** Las células se crecieron en amonio, se lavaron y se incubaron en un medio sin nitrógeno con  $\text{CaCl}_2$  50 mM durante 75 min, tras lo cual se lavaron varias veces y se inocularon inmediatamente en medio fresco sin nitrógeno.

Este hecho descarta nuevamente que la aparición de bandas de menor tamaño se deba a degradación de la proteína. Este resultado confirmó la existencia de una correlación entre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el estado de fosforilación de Ure2. Así concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  muy elevadas Ure2 inducen la desfosforilación completa de Ure2. Así parece que el ayuno de nitrógeno y el  $\text{Ca}^{2+}$  tienen un efecto sumatorio sobre la desfosforilación de Ure2. Sin embargo, desconocemos el papel de esta nueva forma desfosforilada de Ure2. Lo que sí sugieren los resultados es que el  $\text{Ca}^{2+}$  y la calcineurina además de inducir la expresión de *GATI* promueven la desfosforilación de Ure2 de forma que no sólo controlan los niveles del factor transcripcional sino también su localización. Todos los resultados expuestos nos permiten completar nuestro modelo de regulación de la asimilación de nitrógeno por parte de la calcineurina (figura 63).





**Figura 63. Modelo del papel del  $Ca^{2+}$  y la calcineurina en la regulación de la asimilación de nitrógeno.** Las fuentes de nitrógeno alternativas incrementan el contenido intracelular de  $Ca^{2+}$  activándose la calcineurina que induce los niveles de Gat1, que a su vez induce la expresión de *YNR1*, *ENA1* y *GAT2*. Este último actúa transcripcionalmente sobre *PMR1*. Pmr1 regula los niveles de  $Ca^{2+}$  del RE-Golgi, lo que condiciona la entrada desde el exterior del catión y por tanto su contenido citosólico y la activación de la calcineurina. Gat2 además actúa transcripcionalmente sobre *YNA2* induciendo la expresión de *YNR1*. Los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólicos están además involucrados en el estado de fosforilación de Ure2. Las líneas que terminan en punta indican regulación positiva. Las líneas que terminan en barras indican inhibición.

## SINOPSIS

Una de las preguntas clave aun no contestada es como los organismos eucariotas son capaces de sentir el nitrato y señalar su presencia induciendo los genes responsables de su asimilación. La asimilación de nitrato en *H. polymorpha* está sujeta a un doble control: por una parte la represión catabólica por nitrógeno (RCN) inducida por fuentes de nitrógeno preferidas como el amonio o la glutamina y los mecanismos específicos de inducción, elicitados por el propio nitrato. En este capítulo se ha descrito como la calcineurina participa en ambos procesos. Respecto a RCN, en el capítulo anterior se mostró como Gat1 es regulado por la calcineurina. En éste se proporcionan evidencias de que la activación de la calcineurina es mediada, entre otras señales, por las fuentes de nitrógeno alternativas. Por una parte, hemos visto que las fuentes de nitrógeno no preferidas incrementan el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , los niveles de Gat1 y la expresión de *ENAI*, gen regulado por la calcineurina. Además observamos que la ausencia de *CNBI* impide el incremento de la expresión de *ENAI* bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Por tanto, las fuentes alternativas de nitrógeno activan la calcineurina, y como resultado la expresión de *GATI*. De acuerdo con el papel del nitrógeno en la regulación de la calcineurina descrito, también en *S. pombe* la subunidad catalítica de la calcineurina se induce en ayuno de nitrógeno (Plochocka-Zulinska *et al.*, 1995) Respecto a la asimilación de nutrientes, la calcineurina se ha asociado con la utilización de fosfato en *A. fumigatus* (Da Silva Ferreira *et al.*, 2007) y más recientemente con la glucosa en *S. cerevisiae* (Groppi *et al.*, 2011). En esta última la calcineurina controla la expresión de genes que participan principalmente en la homeostasis iónica, en el transporte vesicular y mantenimiento de la pared celular y media la despolimerización de la actina inducida por estrés y el retraso en la transición G<sub>2</sub>-M del ciclo celular. Por otra parte, es esencial en morfogénesis, virulencia y acción antifúngica frente a drogas en *C. albicans*, *C. neoformans* and *A. fumigatus*. Por tanto, es la primera vez que se describe el papel de la calcineurina y el  $\text{Ca}^{2+}$  en la asimilación y señalización del nitrógeno. En este sentido, se observó que la calcineurina a través de Crz1 participa en la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno alternativas. Así,  $\Delta\text{cnbl}$  y  $\Delta\text{crz1}$  presentaron un menor crecimiento en nitrato, nitrito, prolina y metilamonio. Sorprendentemente, estas cepas crecieron menos también en fuentes de nitrógeno preferidas como el amonio y la glutamina. Este resultado apunta a que la calcineurina podría estar involucrada en la regulación positiva de varios genes

responsables de la asimilación de diversas fuentes de nitrógeno. En *S. cerevisiae*, la expresión de algunos de estos genes es dependiente de Gln3 y/o Gat1. Los bajos niveles de Gat1 presentes en  $\Delta cnb1$  son consistentes con dicha hipótesis.

En relación a la inducción de los genes de la asimilación de nitrato, encontramos que la vía de la calcineurina regula la expresión de *YNRI* a través de Gat1 vía Crz1. Se obtuvieron varias evidencias al respecto: (1) tanto  $\Delta cnb1$  como  $\Delta crz1$  fueron más tolerantes a clorato en nitrato que la cepa WT, (2) la delección de *CNBI* y *CRZI* causó un descenso en la expresión de *YNRI*, (3) la expresión de *YNRI* se indujo en presencia de  $Ca^{2+}$  mientras que disminuyó en presencia de EGTA, (4) los niveles de Gat1 fueron muy bajos en  $\Delta cnb1$  y  $\Delta crz1$ . Estos resultados nos permiten confirmar que la regulación de Gat1 por la calcineurina tiene una especial importancia para la desrepresión de los genes de asimilación de nitrato en *H. polymorpha*. Sin embargo, el hecho de que *YNRI* esté sujeto tanto a desrepresión como inducción hizo necesario determinar si la calcineurina participa también en la inducción. Se observó que la calcineurina podría regular la expresión de *YNRI* controlando los niveles de Yna2 vía Gat2. Así, los niveles de Yna2 fueron menores en  $\Delta gat2$  respecto a la cepa WT. En conjunto todas las evidencias nos permiten concluir que la calcineurina participa en la desrepresión y en la inducción de los genes sensibles a RCN a través de Gat1 y Gat2. Gat2 además controlaría los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólicos a través de la expresión de *PMRI*, y como resultado la activación de la calcineurina. Pensamos que se trata de un mecanismo de control negativo de la expresión de los genes sensibles a RCN que operaría en presencia de amonio. Además se observó que el  $Ca^{2+}$  debe entrar en la célula para desencadenar la señalización mediada por la calcineurina.

Por último, observamos que la desfosforilación de Ure2 está retrasada en respuesta al ayuno de nitrógeno en  $\Delta cnb1$  respecto a la cepa WT lo que implica a la calcineurina en la modificación postraducciona de Ure2. Sin embargo, puesto que finalmente Ure2 es desfosforilado, podemos descartar que la calcineurina sea la fosfatasa responsable.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jbc.org/content/suppl/2011/06/07/M111.265116.DC1.html>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 31, PP. 27225–27235, AUGUST 5, 2011  
 © 2011 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

## Npr1 Ser/Thr Protein Kinase Links Nitrogen Source Quality and Carbon Availability with the Yeast Nitrate Transporter (Ynt1) Levels<sup>\*S</sup>

Received for publication, May 25, 2011. Published, JBC Papers in Press, June 7, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.265116

Yusé Martín<sup>1</sup>, Yelvis V. González<sup>2</sup>, Elisa Cabrera<sup>3</sup>, Celia Rodríguez<sup>3</sup>, and José M. Siverio<sup>4</sup>

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedical Technologies, Nitrogen Metabolism Group, Universidad de La Laguna, E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain

Ynt1, the single high affinity nitrate and nitrite transporter of the yeast *Hansenula polymorpha*, is regulated by the quality of nitrogen sources. Preferred nitrogen sources cause Ynt1 dephosphorylation, ubiquitinylation, endocytosis, and vacuolar degradation. In contrast, under nitrogen limitation Ynt1 is phosphorylated and sorted to the plasma membrane. We show here the involvement of the Ser/Thr kinase HpNpr1 in Ynt1 phosphorylation and regulation of Ynt1 levels in response to nitrogen source quality and the availability of carbon. In  $\Delta npr1$ , Ynt1 phosphorylation does not take place, although Ynt1 ubiquitin conjugates increase. As a result, in this strain Ynt1 is sorted to the vacuole, from both plasma membrane and the later biosynthetic pathway in nitrogen-free conditions and nitrate. In contrast, overexpression of *NPR1* blocks down-regulation of Ynt1, increasing Ynt1 phosphorylation at Ser-244 and -246 and reducing ubiquitinylation. Furthermore, Npr1 is phosphorylated in response to the preferred nitrogen sources, and indeed it is dephosphorylated in nitrogen-free medium. Under conditions where Npr1 is phosphorylated, Ynt1 is not and vice versa. We show for the first time that carbon starvation leads to Npr1 phosphorylation, whereas Ynt1 is dephosphorylated and degraded in the vacuole. Rapamycin prevents this, indicating a possible role of the target of rapamycin signaling pathway in this process. We concluded that Npr1 plays a key role in adapting Ynt1 levels to the nitrogen quality and availability of a source of carbon.

Plants, filamentous fungi, and certain yeasts can use nitrate as the sole nitrogen source. In all of them, the nitrate assimila-

tion pathway is highly conserved. Nitrate enters the cells via nitrate transporter(s), and it is then reduced to nitrite and then to ammonium by nitrate and nitrite reductase, respectively. Because reduction of nitrate to ammonium is a highly energy-demanding process and nitrite is potentially toxic to the cells, several mechanisms have been found that regulate this pathway in response to nitrogen and carbon sources (1). In most organisms, genes encoding the enzymatic machinery for nitrate assimilation require nitrate for their induction and are subject to nitrogen catabolite repression (2, 3). In fact, nitrate acts as an inducer once it enters the cells (4–6), besides being the substrate. Thus, nitrate transporter regulation plays a key role in modulating nitrate assimilation gene expression. In this context, the *Arabidopsis thaliana* nitrate transporter CHL1 (NRT1.1) acts as a nitrate sensor independently of its nitrate transport activity (7). CHL1 undergoes phosphorylation at Thr-101, in response to low nitrate concentration. This phosphorylation is carried out by a calcineurin B-like-interacting protein kinase (CIPK23) that is involved in the primary nitrate response (8). Ynt1, the sole high affinity nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* (9, 10), is regulated according to the quality of nitrogen source. In the presence of preferred sources, such as glutamine or ammonium, Ynt1 is ubiquitinylated mainly at Lys-253 and Lys-270. This modification triggers Ynt1 endocytosis and vacuolar degradation (11). In contrast, when the cells are subjected to nitrogen deprivation, Ynt1 phosphorylation is essential for sorting it to the plasma membrane. The nonphosphorylated forms of Ynt1 are thus delivered to the vacuole from the biosynthetic pathway (12). Evidence so far obtained on Ynt1 does not allow us to conclude that it behaves as a nitrate sensor, in the same way as CHL1. However, when nitrate is scarce, its fine regulation by Npr1-mediated phosphorylation targets it to the plasma membrane, facilitating nitrate uptake and consequently nitrate assimilation gene induction (12). There is also strong evidence on the post-translational regulation of *A. thaliana* NRT2.1 and *Aspergillus nidulans* NrtA (13, 14).

Plasma membrane permeases involved in nutrient transport have been extensively studied in *Saccharomyces cerevisiae*. They are internalized and degraded in the vacuole or stabilized at the plasma membrane in response to the quality and quantity of nutrients available in the medium. Ubiquitinylation via E3-ubiquitin ligase Rsp5p and phosphorylation are involved in cellular trafficking of such plasma membrane permeases (15–19). The Ser/Thr protein kinase termed nitrogen permease

\* This work was supported by Grants BFU2007-60172 and BFU2010-16192 (to J.M.S.) from the "Ministerio de Ciencia e Innovación."

This article is dedicated to Professor Wolfredo Wildpret de la Torre on the occasion of his retirement, in gratitude for his efforts in promoting Life Sciences in the Canary Islands, Spain.

<sup>S</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental "Experimental Procedures," "Results," Figs. S1–S3, Tables S1–S11, and additional references.

<sup>1</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). Present address: Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, Ofra s/n, 38320 La Cuesta, Tenerife, Canarias, Spain.

<sup>2</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from CajaCanarias-Universidad de La Laguna.

<sup>3</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), Gobierno de Canarias, Spain.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed: Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Av. Astrofísico Fco. Sánchez s/n. E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain. Tel.: 34922318406; Fax: 34922318354; E-mail: jsiverio@ull.es.

### Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

reactivator 1 (Npr1) plays an outstanding role in regulating nitrogen-related permeases such as Bap2 (19), Mep2 (20), Tat2, and Gap1. In this way, Npr1 is required for Gap1 plasma membrane sorting in the presence of nonpreferred nitrogen sources (15), while under the same conditions, Tat2 is degraded in the vacuole (21). Npr1 is also involved in the ubiquitinylation of Gap1 in an Rsp5-dependent manner (15). The knowledge of Npr1 beyond *S. cerevisiae* is very scarce. In addition to our work in *H. polymorpha*, in *Candida albicans* Npr1 has been reported to regulate the ammonium permease Mep2, unlike Mep1 (22).

Nutritional starvation is the most common stress that yeast cells face in nature. They use several mechanisms to counteract nutritional starvation and to restart the cell cycle when nutrients are newly available. Plasma membrane permeases undergo internalization and vacuolar degradation in response to carbon, nitrogen, or phosphate starvation. This has not been thoroughly studied. However, it is rather well established that tryptophan permease (Tat2) and uracil permease (Fur4) are degraded in response to carbon and nitrogen starvation (23, 24). The high affinity phosphate transporter Pho84 is also degraded in external phosphate below 30–40  $\mu\text{M}$  and under carbon starvation conditions (25–27). In contrast, Gap1 and HpYnt1 are remarkably stable under nitrogen starvation conditions (11, 12, 17).

Hall and co-workers (21) showed that Npr1 activity is controlled by the TOR<sup>5</sup> signaling pathway in response to nitrogen source quality. The inactivation of TOR by incubation in poor nitrogen sources provided a nonphosphorylated active form of Npr1. However, in good nitrogen sources where TOR is active, Npr1 is phosphorylated and inactive. Indeed, Npr1 has been shown to have 20 rapamycin-sensitive phosphorylation sites clustered in two regions within the N-terminal serine-rich domain (28). Growing evidence suggests that TORC1 is involved in vesicle trafficking and may also sense the cellular nutrient status in endogenous membrane structures. Accordingly, several components of TORC1 have been localized to the Golgi, endosome, or other vesicle compartments by different methods. In this sense, TORC1 affects late steps of endocytosis, and Pmr1, a Golgi-localized ATPase that transports  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ions from the cytoplasm into the Golgi, down-regulates TORC1 but also Npr1, which is mostly cytosolic, although a portion is localized at the Golgi. Consistent with this, an increase in Gap1 was observed in *npr1* mutants at the plasma membrane (29–33). Moreover, in addition to nutrients,  $\text{K}^+$  has also been found to be involved in plasma membrane permease stability (34).

The post-translational regulation of nitrate transporters reveals its importance in modulating nitrate assimilation genes (8, 12). Therefore, the study of nitrate transporter modifications in response to environmental and nutritional conditions is essential to achieve further understanding of nitrate assimilation control. Indeed, in *H. polymorpha*, an ORF encodes for a protein with a high similarity to ScNpr1, and its deletion abolishes Ynt1 phosphorylation (12). However, the role of HpNpr1 kinase in the post-translational regulation of Ynt1 was totally

unknown until now. We found a new connection between carbon sources and Npr1; indeed, Npr1 is closely involved in the cellular fate of Ynt1, according to the nitrogen quality and carbon source availability. Npr1 undergoes a basal phosphorylation under nitrogen deprivation, which increases in good nitrogen sources and carbon starvation. Rapamycin also affects the phosphorylation of Npr1 and Ynt1 under carbon starvation, suggesting that the TOR kinase pathway is involved in Npr1 regulation in response to carbon availability.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Strains and Media**—The *H. polymorpha* strains used in this study (supplemental Table S1) are all derivatives of NCYC495 *leu2<sup>-</sup>ura3<sup>-</sup>*. Cells were grown in YPD media (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) or synthetic media containing 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (YNB), 2% (w/v) glucose, and the appropriate nitrogen source for each experiment. In  $\text{K}^+$  experiments, cells were grown in synthetic  $\text{K}^+$ -free medium (YNB-F) (0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, ammonium sulfate, and potassium (ForMedium™ United Kingdom, CYN7505) supplemented with 2% glucose, 5 mM ammonium sulfate, and 20 mM potassium chloride buffered at pH 5.5 with 50 mM MES-Tris. To induce nitrate assimilation genes at restricted  $\text{K}^+$  conditions, cells were then incubated in a homemade yeast nitrogen base following the Difco recipe but without amino acids, ammonium sulfate, or monobasic potassium phosphate. This was brought to pH 5.5 with 50 mM MES-Tris; 2% glucose and the indicated nitrogen source were then added.

To obtain yeast cultures bearing Ynt1, cells were grown in 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (YNB), 2% (w/v) glucose, 5 mM ammonium chloride, centrifuged, and resuspended at 10 mg/ml in the same medium but without nitrogen for 1 h. After that, cells were incubated in 5 or 10 mM sodium nitrate for 1.5–2 h. In the experiments where the effect of carbon starvation on Ynt1 was studied, once the cells were incubated in nitrate they were transferred to fresh medium (YNB) without nitrate in the presence of 2% glucose (YG) or absence (Y). The presence or absence of nitrate did not affect these results.<sup>6</sup> Any modification of this procedure was indicated for each experiment. Whenever necessary, media were supplemented with 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-leucine, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  uracil, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zeocin.

**Npr1 Tagging**—To tag Npr1 with an HA epitope, we constructed the pHANPR1LEU2 plasmid following the strategy described previously (21). First, we cloned a PCR fragment containing the *NPR1* promoter and the initiation codon in pGEM-T easy (Promega, Madison, WI). Then the *HA-NPR1* open reading frame without initiation codon but with the *NPR1* terminator was cloned in the plasmid derived from this first step. This *NPR1*-tagged version was made by PCR with a primer containing the HA sequence at the 5' end. The *LEU2* gene, used as auxotrophic marker, was inserted into the last plasmid.

**Nitrate Uptake**—High affinity nitrate uptake was determined by measuring depletion of extracellular nitrate as described previously (9). To determine the nitrate concentration enzy-

<sup>5</sup> The abbreviation used is: TOR, target of rapamycin.

<sup>6</sup> Y. V. González, unpublished results.

matically, the purified *H. polymorpha* nitrate reductase enzyme was used (NECI, Lake Linden, MI).

**Yeast Cell Extracts and Immunoblotting**—Cell extracts were prepared as described previously (9). For Ynt1 and Gap1 immunoblots, plasma membrane-enriched fraction was resuspended in 70  $\mu$ l of 0.25 mg/ml Triton X-100 and then mixed with 4 $\times$  Sample Buffer (4 $\times$ : 12% (w/v) SDS, 6% (v/v) 2-mercaptoethanol, 30% (w/v) glycerol, 0.05% (w/v) Serva Blue G, 150 mM Tris-HCl, pH 7). Samples were heated at 40  $^{\circ}$ C for 30 min and then subjected to SDS-PAGE. Ynt1 was probed with 1:1500 anti-Ynt1 antiserum and Gap1 with 1:10,000 anti-ScGap1 antiserum (gift of Dr. B. André, Brussels); Pma1, used as load control and plasma membrane marker, was immunodetected with rabbit anti-ScPma1 antiserum (gift of Dr. R. Serrano, Valencia, Spain). For HA-Npr1 immunodetection, whole yeast cell extracts for SDS-PAGE and immunoblot analysis were prepared by resuspending 100 mg of cells in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 10 mM  $\text{NaN}_3$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 10 mM NaF plus Complete Mini protease inhibitor mixture (Roche Applied Science), and 2 mM PMSE) homogenized in the FastPrep homogenizer device (ThermoSavant LifeSciences, Hampshire, UK) for 20 s at 6.0 m/s and removing cell debris by centrifugation at 500  $\times$  g for 10 min at 4  $^{\circ}$ C. Samples were heated at 95  $^{\circ}$ C for 5 min. To determine Ynt1-Ub conjugates by immunoblots, cells were processed as in Ref. 11. Immunoblots were performed from a minimum of three independent experiments.

**Gene Disruption**—*NPR1*, *END4*, and *VPS27* were disrupted by replacing the chromosomal copy by one containing the partially deleted gene target sequence flanking the *H. polymorpha* auxotrophic markers *URA3* or *LEU2*. Further information on constructing vectors and cassettes is available on request.

**$\lambda$ -Protein Phosphatase Treatment**—50  $\mu$ g of proteins was incubated with 150 units of  $\lambda$ -protein phosphatase (New England Biolabs, Beverly, MA) for 25 min at 30  $^{\circ}$ C as indicated (12).

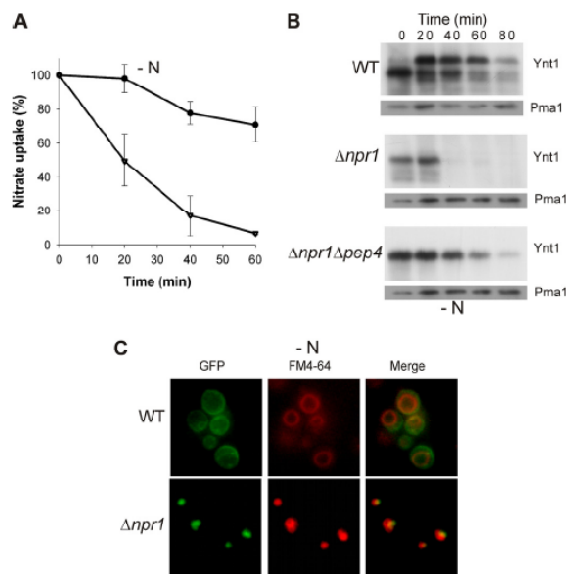
**Fluorescence Microscopy**—To follow Ynt1 cellular localization, Ynt1 was fused to GFP as described previously (11). Images were obtained under an epifluorescence Nikon Eclipse 50i microscope equipped with a 1200F camera (Nikon, Kanagawa, Japan).

## RESULTS

**Npr1 Kinase Is Essential to Maintain Ynt1 Levels under Nitrogen Limitation Conditions**—A previous characterization of *H. polymorpha*  $\Delta npr1$  is shown in the supplemental Fig. S1.

Under nitrogen limitation, nitrate uptake in  $\Delta npr1$  mutant falls abruptly, unlike the WT that remains stable longer (Fig. 1A). In the same way, Ynt1 levels in  $\Delta npr1$  are strongly correlated with those observed for nitrate uptake (Fig. 1B). Degradation of Ynt1 in  $\Delta npr1$  was almost fully prevented by deleting the *PEP4* gene that encodes for the vacuolar proteinase A (Fig. 1B). As expected, Ynt1-GFP co-localizes with the vacuole in  $\Delta npr1$  cells subjected to nitrogen deprivation, whereas in a WT strain, Ynt1 remains at the cell surface even after 80 min (Fig. 1C). These results show that under nitrogen deprivation Npr1 is involved in regulating Ynt1 levels by controlling its delivery to the vacuole for degradation.

## Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels



**FIGURE 1. Npr1 is essential to maintain Ynt1 levels under nitrogen limitation conditions.** A, nitrate uptake by WT (●) and  $\Delta npr1$  (▼) strains transferred to nitrogen-free medium. Values are expressed as a percentage of nitrate transport rate (100% =  $0.803 \pm 0.03$  nmol of nitrate  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) of cells. B, Ynt1 levels in WT,  $\Delta npr1$ , and  $\Delta npr1\Delta pep4$  during nitrogen starvation. A and B, cells were previously incubated in 5 mM nitrate for 2 h. Pma1 was used as loading control. C, cellular localization of Ynt1-GFP in WT and  $\Delta npr1$  after 40 min of nitrogen deprivation. Before nitrate incubation, vacuolar membranes were stained with FM4-64.

**In a  $\Delta npr1$  Mutant, Ynt1 Is Sorted to the Vacuole from Endocytic and Biosynthetic Pathways**—The role of Npr1 in controlling the cellular fate of Ynt1 required elucidation, in addition to the pathways involved. For this, we disrupted genes involved in targeting proteins, such as *END4* and *VPS27*, to the vacuole. *END4* is involved in actin organization and plasma membrane endocytosis (35). In  $\Delta end4$ , Ynt1 endocytosis was almost abolished (Fig. 2A). *VPS27* is an endosomal protein required for recycling Golgi proteins, forming luminal membranes and sorting ubiquitinated proteins destined for degradation to the vacuole. As a result,  $\Delta vps27$  mutation prevents endocytosis, trans-Golgi network, and resident vacuolar proteins from being delivered to the vacuole (36). When strains combining disruptions of *NPR1* with *END4* or *VPS27* were incubated in nitrate-containing medium and then transferred to one deprived of nitrogen, we observed that Ynt1 disappearance was greater in the double mutant  $\Delta npr1\Delta end4$  than in  $\Delta end4$  but slower than in  $\Delta npr1$ . However, it remained significantly slower than in WT (Fig. 1B) or  $\Delta end4$  strains (Fig. 2A). These observations were consistent with those obtained by fluorescence microscopy of Ynt1-GFP. Indeed, in  $\Delta npr1$  after 40 min of nitrogen deprivation, all the fluorescence was localized in the vacuole, whereas in the  $\Delta npr1\Delta end4$  strain most was vacuolar but some was still at the cell surface (Fig. 2B). These results suggest that, in  $\Delta npr1$ , Ynt1 is sorted to the vacuole from both the plasma membrane and the biosynthetic pathway. To further confirm this, we tested Ynt1 degradation in a  $\Delta npr1\Delta vps27$  strain in response to nitrogen deprivation. In contrast with  $\Delta npr1\Delta end4$ ,  $\Delta vps27$

**Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels**

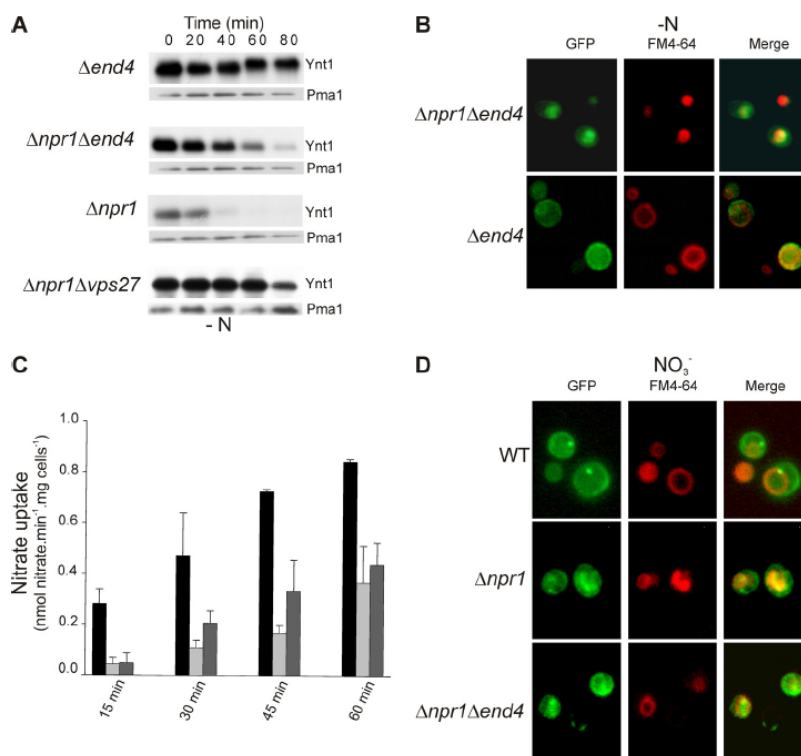


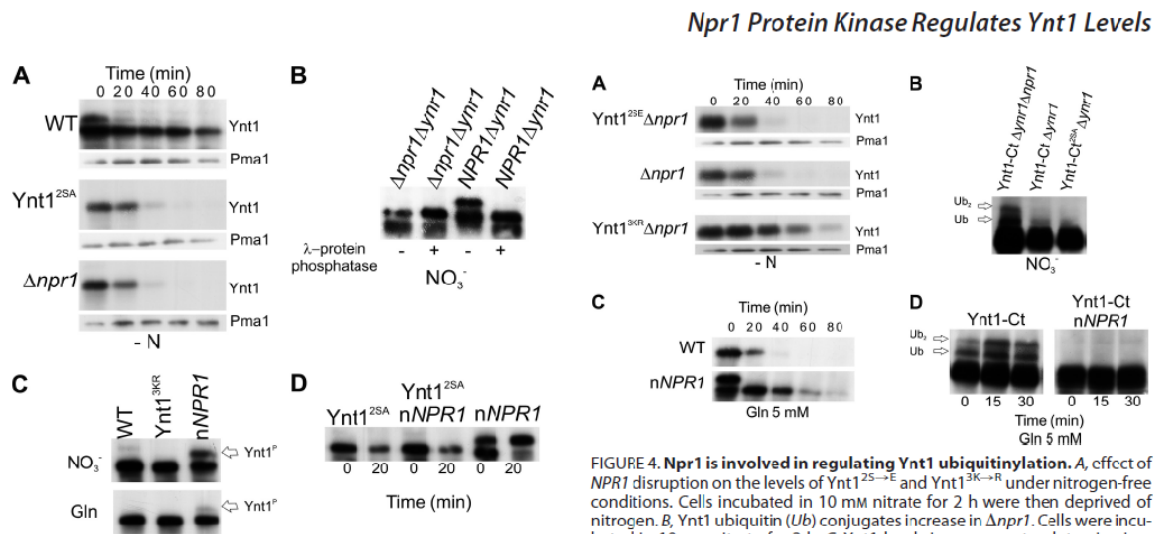
FIGURE 2. **NPR1 disruption causes sorting of Ynt1 to the vacuole.** A, levels of Ynt1 in different mutant strains subjected to nitrogen deprivation. Cells were incubated in 10 mM nitrate for 2 h and deprived of nitrogen for 80 min. B, cellular distribution of Ynt1-GFP before and after 40 min of incubation in a nitrogen-free medium. C, time course of nitrate uptake. WT (black),  $\Delta npr1$  (light gray),  $\Delta npr1\Delta end4$  (gray) were grown in ammonium, deprived of nitrogen for 2 h, and then incubated in 0.5 mM nitrate, and then nitrate uptake was determined at the indicated times. D, cellular localization of Ynt1-GFP. Cells from nitrogen-free medium were incubated in 1 mM nitrate for 1 h.

almost suppresses *NPR1* deletion, and Ynt1 levels are much more stable than in  $\Delta npr1\Delta end4$  (Fig. 2A). Therefore, in response to nitrogen-free conditions, Npr1 is required for Ynt1 delivery to the plasma membrane and its further stabilization there.

We then asked whether the action of Npr1 on Ynt1 is restricted to nitrogen deprivation or whether it also affects the rate of Ynt1 appearance in response to nitrate. To test this, we estimated the rate of delivery of Ynt1 to the plasma membrane upon nitrate incubation. The cells were subjected to nitrogen starvation and then incubated in 0.5 mM nitrate. Afterward, nitrate uptake rate was measured, as an index of that delivery rate, showing a rapid increase (Fig. 2C) in WT. In contrast, nitrate uptake was slower to appear in  $\Delta npr1$  and  $\Delta npr1\Delta end4$ , being slightly higher in this latter mutant due to the stability of the Ynt1 present at the plasma membrane, as a result of  $\Delta end4$  mutation. The behavior of the Ynt1-GFP was consistent with that observed for nitrate uptake appearance, so after incubation in nitrate, Ynt1-GFP was at the cell surface in WT. However, in  $\Delta npr1$  and  $\Delta npr1\Delta end4$  mutants, Ynt1-GFP cellular distribution was heterogeneous, with a high cytosolic accumulation (Fig. 2D). Therefore, our results indicate that in nitrate and nitrogen-free conditions, Npr1 prevents sorting of newly synthesized Ynt1 to the vacuole, facilitating its delivery to the plasma membrane.

**Phosphorylation of Ynt1 Is Mediated by Npr1**—Nitrogen limitation induced phosphorylation of Ynt1 at Ser residues 244 and 246, located in the central hydrophilic domain. Under nitrogen limitation, a nonphosphorylatable form of Ynt1 (S244A and S246A) is missorted to the vacuole (12). The similarity in behavior of the nonphosphorylatable Ynt1 with  $\Delta npr1$  prompted us to study the relationship between Ynt1 phosphorylation and Npr1 in detail. For this, we compared the levels of Ynt1 under nitrogen deprivation in  $\Delta npr1$  and the Ynt1<sup>2S→A</sup> mutant. In both strains, Ynt1 disappearance (Fig. 3A) and the drop in nitrate uptake were very rapid. Ynt1-GFP was localized in the vacuole after a few minutes (data not shown). We then studied the phosphorylation state of Ynt1 in a  $\Delta npr1$  mutant. For this, we disrupted the nitrate reductase gene (*YNR1*) (37) in a  $\Delta npr1$  strain. The  $\Delta ynr1$  mutant was unable to assimilate nitrate, which acts only as inducer and as a result ensures high levels of phosphorylated Ynt1. Immunoblots showed the presence of a slow mobility band of Ynt1 in  $\Delta ynr1$ , not detected in  $\Delta npr1\Delta ynr1$  (Fig. 3B).  $\lambda$ -Protein phosphatase treatment of total protein extracts confirmed that this band corresponds to a phosphorylated form of Ynt1 (Fig. 3B), allowing us to conclude that Npr1 is necessary for Ynt1 phosphorylation.

Further evidence on the role of Npr1 in Ynt1 phosphorylation was obtained in strains bearing several copies of *NPR1* (*nNPR1*). In this strain, Ynt1 is phosphorylated even in gluta-



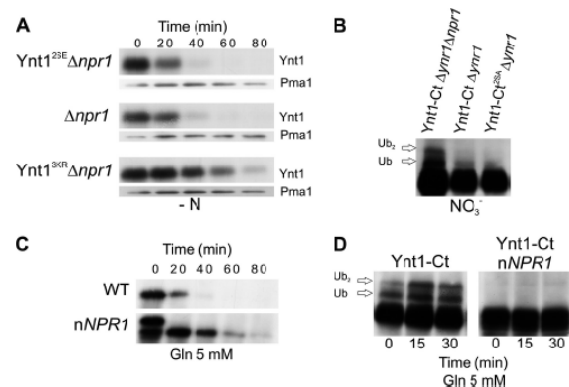
**FIGURE 3. Phosphorylation of Ynt1 is mediated by Npr1.** A, immunoblots of Ynt1 from nitrogen-deprived cells. Previously, cells were incubated in 10 mM nitrate. B, Ynt1 mobility in SDS-PAGE of protein extracts treated (+) or nontreated (-) with  $\lambda$ -protein phosphatase. The indicated strains were incubated in 5 mM nitrate for 2 h. C, phosphorylation state of Ynt1 in WT, Ynt1<sup>3K→R</sup> and nNPR1 strains. Protein extracts were obtained from cells incubated in 10 mM nitrate for 2 h (upper panel) or 40 min after 5 mM glutamine addition (lower panel). D, Ynt1 phosphorylation is dependent on Npr1 and takes place at Ser-244 and Ser-246. Samples were taken from cells incubated in 10 mM nitrate for 2 h and after 20 min of nitrogen deprivation.

mine or high nitrate, unlike in WT where it is scarcely or not phosphorylated (Fig. 3C). To rule out this being a consequence of increased Ynt1 levels, the strain bearing the Ynt1<sup>3K→R</sup> version was used, which accumulated Ynt1, because it lacks the lysine residues required for efficient ubiquitinylation and further endocytosis. Moreover, it is worth noting that in a WT genetic background, Ynt1<sup>3K→R</sup> is phosphorylated like Ynt1 during nitrogen deprivation (data not shown). These results further support the involvement of Npr1 in Ynt1 phosphorylation.

The high levels of Ynt1 phosphorylation in the nNPR1 strain also allow us to determine the residues involved in its phosphorylation mediated by Npr1. We already showed that Ser-244 and Ser-246 are phosphorylated in response to nitrogen deprivation (12). Ynt1-phosphorylated forms were not detected in either Ynt1<sup>2S→A</sup> or in nNPR1Ynt1<sup>2S→A</sup> strains, but they were in nNPR1Ynt1 (Fig. 3D). We concluded that Ynt1 phosphorylation at Ser-244 and Ser-246 is mediated directly or indirectly by Npr1.

**Npr1 Regulates Ynt1 Ubiquitinylation**—We reasoned that if the effect of NPR1 disruption on Ynt1 was due entirely to the absence of Ynt1 phosphorylation, then replacing the serine phosphoacceptors by glutamic acid to mimic phosphorylation would reverse it. However, Ynt1 behaved the same in both  $\Delta npr1$  and  $\Delta npr1$  Ynt1<sup>2S→E</sup> strains under nitrogen limitation conditions, indicating that NPR1 deletion acts beyond Ynt1 phosphorylation (Fig. 4A). Despite this, in a WT genetic background, Ynt1<sup>2S→E</sup> reversed Ynt1<sup>2S→A</sup> in such a way that Ynt1<sup>2S→E</sup> levels were almost unaltered under nitrogen limitation, unlike Ynt1<sup>2S→A</sup> (12). In  $\Delta npr1$ , Ynt1 degradation was nevertheless counteracted when the Lys residues involved in

### Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels



**FIGURE 4. Npr1 is involved in regulating Ynt1 ubiquitinylation.** A, effect of NPR1 disruption on the levels of Ynt1<sup>2S→E</sup> and Ynt1<sup>3K→R</sup> under nitrogen-free conditions. Cells incubated in 10 mM nitrate for 2 h were then deprived of nitrogen. B, Ynt1 ubiquitin (Ub) conjugates increase in  $\Delta npr1$ . Cells were incubated in 10 mM nitrate for 2 h. C, Ynt1 levels in response to glutamine in a strain overexpressing NPR1 gene. Cells were incubated in 10 mM nitrate, and then 5 mM glutamine was added. D, Ynt1 ubiquitin conjugates in a strain overexpressing NPR1. After 2 h of incubation in 10 mM nitrate (0 min), 5 mM glutamine was added.

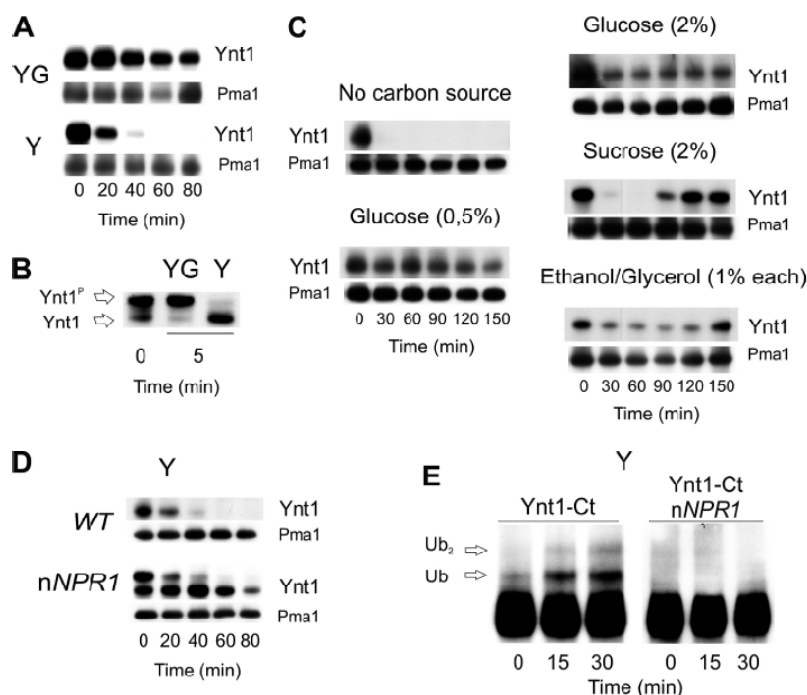
Ynt1 ubiquitinylation (11) were mutated to Arg (Fig. 4A). This finding suggested a close relationship between Ynt1 ubiquitinylation and Npr1. To test this, the ubiquitinylation of Ynt1 in a  $\Delta npr1$  mutant were determined by the use of  $\Delta npr1\Delta ynr1$  bearing the Ynt1<sup>Δ232–286</sup>-Ct236–286 (Ynt1-Ct) mutation, achieved by fusing the core sequence (236–286) of the central cytosolic domain to the C terminus of Ynt1<sup>Δ232–286</sup> (11). The mutation of the nitrate reductase gene (*YNR1*) ensures high levels of Ynt1, whereas Ynt1-Ct provides a robust Ynt1-ubiquitinylation assay (11). When the cells were incubated in nitrate, the  $\Delta npr1$  mutant showed an increased amount of Ynt1 ubiquitin conjugates, as seen in WT cells after addition of glutamine. The nonphosphorylatable form of Ynt1 (Ynt1<sup>2S→A</sup>) exhibited the same ubiquitinylation as the WT (Fig. 4B). These results indicate that Npr1 down-regulates the ubiquitinylation of Ynt1, independently of Ynt1 phosphorylation.

We then asked whether NPR1 in multicopy (nNPR1) further stabilizes Ynt1 by lowering the amount of ubiquitin conjugates. This was assayed on Ynt1 down-regulation in response to glutamine. In WT, the amount of Ynt1 falls abruptly, but in an nNPR1 it did not (Fig. 4C). Examination of Ynt1 ubiquitinylation in WT and the nNPR1 mutant revealed that the Ynt1 ubiquitin conjugates could not be detected in the nNPR1 strain, even after the addition of glutamine (Fig. 4D). These results support a close relationship between Ynt1 ubiquitinylation and Npr1. However, it is worth noting that the ubiquitinylation is independent of Ynt1 phosphorylation.

To gain further insights into the relationship between Npr1 and Rsp5, we constructed a loss of function *rsp5-1* temperature-sensitive mutant strain (38). Most plasma membrane proteins in yeast undergo Rsp5-mediated ubiquitinylation and subsequent internalization (39). However, in *rsp5-1*, Ynt1 down-regulation was not affected (supplemental Fig. S2), possibly because the ubiquitinylation activity remaining in this temperature-sensitive mutant (*rsp5-1*) is enough to



**Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels**



**FIGURE 5. Ynt1 is down-regulated by carbon starvation, and this is counteracted by Npr1 overexpression.** A, Ynt1 is down-regulated after carbon withdrawal. Cells were incubated in YNB, 2% glucose, and 5 mM nitrate for 2 h and then transferred to the same medium without nitrogen, with 2% glucose (YG) and without (Y). B, in the absence of a carbon source, Ynt1 is rapidly dephosphorylated. Ynt1 SDS-PAGE mobility shift was determined in protein extracts from cells incubated for 2 h in 5 mM nitrate then transferred for 5 min to fresh medium with 2% glucose (YG) and without (Y). C, Ynt1 levels in cells incubated in different carbon sources. Cells were incubated in YNB plus 5 mM nitrate and 2% glucose for 2 h and then transferred to the same medium with 5 mM nitrate and the carbon sources indicated. D, overexpression of Npr1 stabilizes Ynt1 even in carbon-free medium. E, Ynt1 ubiquitinylation in a strain overexpressing NPR1. After 2 h of incubation in 5 mM nitrate, cells were nitrogen-deprived for 30 min and then transferred to a medium with no carbon source (Y, 0 min).

ubiquitinylate Ynt1 and deliver it to the vacuole for degradation. In contrast, Gap1 (supplemental Fig. S1) and Hak1<sup>7</sup> increase their stability in response to preferred nitrogen sources or K<sup>+</sup> in *rsp5-1*, confirming the phenotype of this mutant. Similarly, in the *S. cerevisiae* RSP5 conditional mutants *rsp5-1* and *spa1-1*, the high affinity iron transporter Fet1-Fet3 and P<sub>i</sub> transporter Pho84 are unaffected in response to iron or P<sub>i</sub> abundance, respectively (40, 41).

**Ynt1 Levels Are Also Regulated by the Carbon Sources and Dependent on Npr1**—It has been shown in our laboratory that, in addition to the nitrogen source, *YNT1* gene expression is regulated by the carbon source.<sup>8</sup> Here, we investigated whether this regulation also takes place at the post-translational level. We have found that carbon starvation also down-regulates Ynt1 (Fig. 5A), which correlates with a fast dephosphorylation of Ynt1 (Fig. 5B), as occurs with glutamine (12). The presence of different carbon sources, such as 0.5% glucose, sucrose, ethanol, and glycerol, restores the levels of Ynt1 (Fig. 5C). Therefore, we concluded that carbon starvation down-regulates Ynt1 levels. We then asked if Npr1 is also involved in regulating Ynt1 levels in a medium lacking a carbon source. To test this, we compared the levels of Ynt1 in WT and in *nNPR1* strains transferred to a

carbon-free medium. In the *nNPR1* strain, Ynt1 was clearly resistant to degradation (Fig. 5D), indicating that Npr1 is involved in adapting Ynt1 levels to carbon source availability. To further analyze the role of Ynt1 ubiquitinylation in response to carbon starvation, the strain bearing Ynt1-Ct was used. Ynt1 appears clearly ubiquitinylation in response to carbon starvation (Fig. 5E); however, ubiquitinylation disappears when *NPR1* is overexpressed. Altogether our results clearly indicate that Npr1 also plays a key role in adapting Ynt1 levels to carbon source availability, acting on Ynt1 via its phosphorylation and ubiquitinylation.

We also explored whether calcineurin could play some role in signaling the effect of nitrogen and carbon sources on Ynt1 post-translational regulation. To address this, the strain  $\Delta$ *cnb1* lacking the regulatory subunit of calcineurin was used (42). In the conditions studied, the Ynt1 phosphorylation or degradation pattern shows no significant differences between  $\Delta$ *cnb1* and WT (supplemental Fig. S3).

**Npr1 Phosphorylation State Is Regulated by Nitrogen Source Quality, Carbon Source, and K<sup>+</sup> Availability** The effect of Npr1 on post-translational regulation of Ynt1 was clearly observed under nitrogen limitation and nitrate and carbon starvation. We also studied the Npr1 phosphorylation state to correlate it with its involvement in Ynt1 regulation, using a strain bearing a functional N-terminal HA-tagged Npr1. As shown in

<sup>7</sup> Y. Martín and E. Cabrera, unpublished results.

<sup>8</sup> M. D. Pérez and Y. V. González, unpublished results.

Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

Fig. 6A, the SDS-PAGE mobility of Npr1 depends on the nitrogen source. Thus, Npr1 from cells incubated in glutamine presented less mobility than that from cells incubated in nitrate or nitrogen-free media.  $\lambda$ -Protein phosphatase treatment of cell extracts confirmed the phosphorylation of Npr1 in response to glutamine. Moreover, this treatment of cell extract from nitro-

gen-deprived cells revealed that Npr1 migrated faster than when not treated (Fig. 6B). This suggests that Npr1 may be phosphorylated in nonpreferred nitrogen sources, and addition of glutamine causes further phosphorylation. A close correlation was observed between glutamine-dependent Npr1 phosphorylation and Ynt1 dephosphorylation, such as in a  $\Delta npr1$  mutant (Fig. 6A). Therefore, the capacity of Npr1 to directly or indirectly phosphorylate Ynt1 is regulated by the nitrogen sources, such that when Npr1 was phosphorylated no Ynt1 phosphorylation was observed.

The effect of rapamycin on the phosphorylation state of Npr1 and Ynt1 levels was tested by incubating *H. polymorpha* in glutamine plus 0.5–3  $\mu$ M rapamycin. Npr1 mobility was not affected while Ynt1 was being degraded, unlike those cells transferred to N-free medium (Fig. 6, C and D). Rapamycin mimicked nitrogen derepression for those genes subject to nitrogen catabolite repression (6). These results contrast with those obtained for ScNpr1, where rapamycin strongly modifies the nitrogen-dependent phosphorylation pattern of Npr1 (18).

As Npr1 is modulated by phosphorylation, we studied whether Npr1 was affected by carbon starvation. In cells subjected to carbon starvation, Npr1 was found to be phosphorylated (Fig. 7A), although less so than in glutamine (Fig. 6B), which strongly suggested that Npr1 is inactivated by phosphorylation. Thus, when Npr1 is phosphorylated, or disrupted, Ynt1 is not. However, Npr1 phosphorylation could also be involved in recognizing and binding its substrates. In contrast to what was observed in glutamine, 1  $\mu$ M rapamycin prevents Ynt1 degradation in response to carbon starvation (Fig. 7C). Consistent with this, rapamycin also prevented phosphorylation of Npr1 in carbon starvation (Fig. 7D), as well as Ynt1 dephosphorylation (Fig. 7E). These results suggest that Npr1 responds to carbon starvation in a TOR pathway-dependent manner.

We also explored whether  $K^+$  levels also affect Npr1 phosphorylation and Ynt1 levels.  $K^+$  has been found to be involved

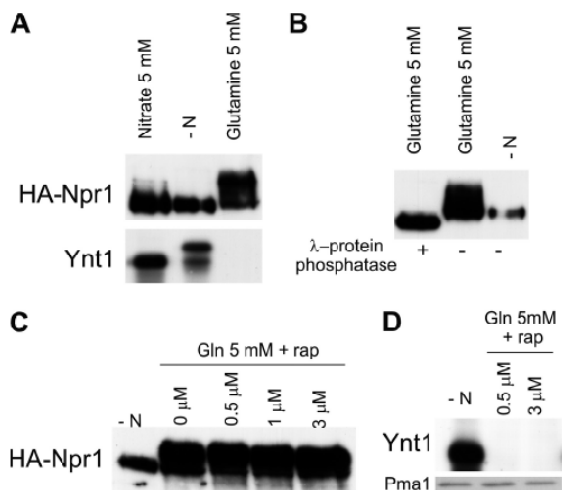


FIGURE 6. Nitrogen-dependent phosphorylation of Npr1. A, HA-Npr1 (upper panel) and Ynt1 (lower panel) mobility in SDS-PAGE using anti-HA and anti-Ynt1. Cells were incubated in 5 mM nitrate for 1.5 h and then transferred to a nitrogen free medium or 5 mM glutamine for 1 h. B, HA-Npr1 SDS-PAGE mobility changes in response to different nitrogen sources are due to phosphorylation. A WT strain expressing HA-Npr1 was grown in ammonium and then transferred to glutamine or N-free medium for 1 h. Protein extracts were treated (+) or nontreated (-) with  $\lambda$ -protein phosphatase. C, effect of rapamycin (rap) on the phosphorylation state of Npr1. Cells were collected after incubation in the indicated medium for 1 h, and HA-Npr1 was detected by immunoblot. D, effect of rapamycin treatment on glutamine-induced down-regulation of Ynt1. WT was incubated in nitrate and then transferred to a medium without nitrogen or with 5 mM glutamine plus 0.5 or 3  $\mu$ M rapamycin, for 40 min. Pma1 was used as loading control.

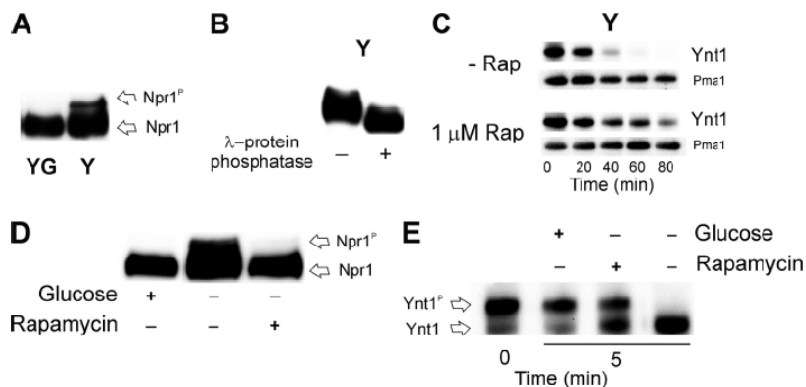
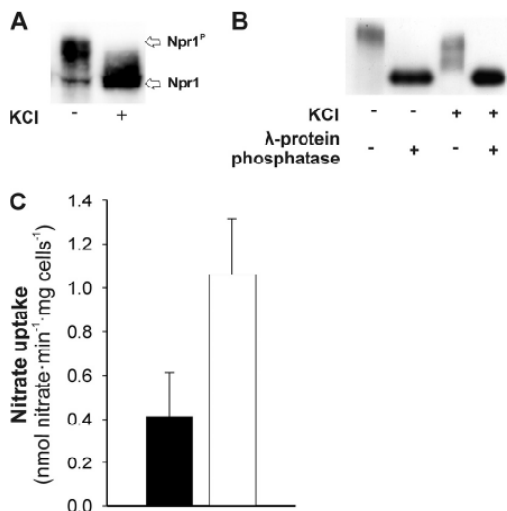


FIGURE 7. Carbon-dependent Npr1 and Ynt1 regulation is rapamycin-sensitive. A, HA-Npr1 SDS-PAGE mobility in carbon-starved cells. Cells were incubated in 5 mM nitrate for 1 h and then transferred to the same medium without nitrogen with 2% glucose (YG) or without (Y). B, HA-Npr1 SDS-PAGE mobility in extracts from carbon-starved cells treated with  $\lambda$ -protein phosphatase (+) and not treated (-). C, rapamycin (Rap) prevents Ynt1 down-regulation in response to carbon starvation. Cells incubated in 5 mM nitrate for 2 h were transferred to the same medium without nitrogen and glucose (Y) in the presence and absence of 1  $\mu$ M rapamycin. D, rapamycin prevents Npr1 phosphorylation. HA-Npr1 SDS-PAGE mobility shift was determined in protein extracts from cells incubated in 5 mM nitrate for 1 h then transferred to fresh nitrogen-free medium in the presence of 2% glucose or its absence, with and without 1  $\mu$ M rapamycin. E, rapamycin prevents Ynt1 dephosphorylation in response to carbon starvation. Cells incubated for 2 h in 5 mM nitrate were transferred to nitrogen-free medium at the condition indicated for 5 min. Rapamycin was used at 1  $\mu$ M.

**Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels**

in the stabilization of several permeases at the plasma membrane (34). A clear increase in the phosphorylation of Npr1 was observed in the absence of K<sup>+</sup> but only in preferred nitrogen

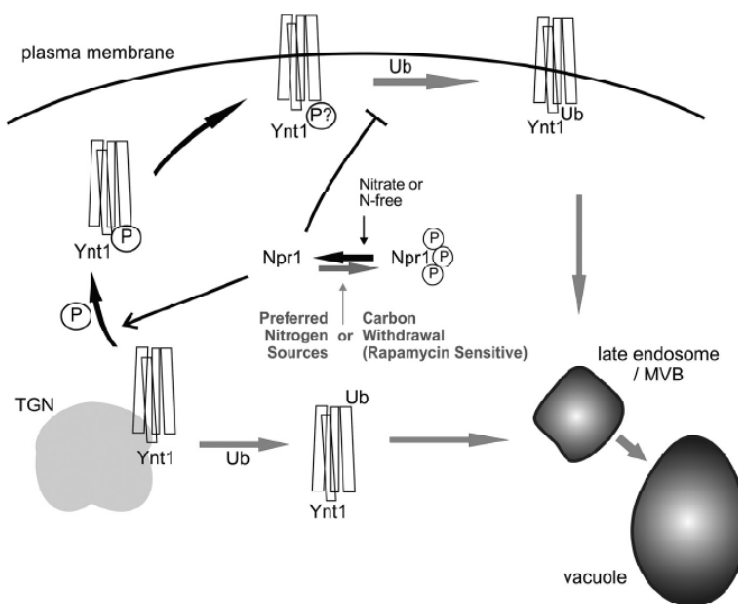


**FIGURE 8. Potassium deprivation induces phosphorylation of Npr1.** A, HA-Npr1 SDS-PAGE mobility. WT cells expressing HA-Npr1 were incubated in ammonium with 20 mM KCl or without for 2 h. B, Npr1 SDS-PAGE mobility changes are due to phosphorylation. Cell extracts were treated with λ-protein phosphatase (+) or nontreated (-). C, cells deprived of nitrate present low nitrate uptake. Cells were grown in ammonium, deprived of nitrogen for 2 h, and then incubated in 0.5 mM nitrate in the presence of 20 mM KCl (white bars) or absence (black bars) for 90 min, and then nitrate uptake was determined.

sources such ammonium or glutamine (Fig. 8, A and B). This makes it difficult to see the effect on Ynt1, because Ynt1 is only present in cells incubated in nitrate. However, because we have consistently observed that changes in Npr1 phosphorylation affect that of Ynt1 and its levels, we studied the effect of K<sup>+</sup> absence on Ynt1. No significant changes were observed in Ynt1 by Western blotting, although nitrate uptake decreased (Fig. 8C), and this alteration in uptake could be due in part to electrochemical potential change in the absence of K<sup>+</sup>. Indeed, addition of 20 mM KCl restored nitrate transport. We concluded that the absence of K<sup>+</sup> alters the Npr1 phosphorylation state in preferred nitrogen sources; nevertheless, this condition does not seem to affect Ynt1 but does influence nitrate uptake. In Fig. 9, we summarize our current knowledge about the role of Npr1 in regulating Ynt1.

**DISCUSSION**

In this study, we uncover the role of Npr1 in regulating the Ynt1 levels in response to nitrogen source quality and carbon availability. This yeast protein kinase belongs to a subgroup involved in the regulation of several permeases (15, 17, 34, 43). *HpΔnpr1* showed deficient growth in low ammonium or other nitrogen sources such as proline. However, contrary to expectations, Gap1 levels are not affected in the *Δnpr1* strain, indicating that this protein kinase is not involved in Gap1 activation in *H. polymorpha* (supplemental Fig. S1). Nevertheless, the poor growth of *Δnpr1* in ammonium suggests that ammonium permeases are also under control of *H. polymorpha* Npr1. The regulatory roles of HpNpr1 do not fully coincide with those observed in *S. cerevisiae*. Consistent with this, we found that



**FIGURE 9. Npr1 is involved in sorting and stabilizing Ynt1 at the plasma membrane.** In preferred nitrogen sources or carbon starvation, Npr1 is polyphosphorylated, although Ynt1 is not phosphorylated, being therefore sorted via late endosome/multivesicular body (MVB) to the vacuole from the trans-Golgi network (TGN) (gray arrows). Under these conditions, Ynt1 located at the cell surface is ubiquitinated (Ub), endocytosed, and then degraded in the vacuole. In contrast, in nitrate or nitrogen-free (N-free) medium, in the presence of a carbon source, Npr1 is dephosphorylated, although Ynt1 is phosphorylated and highly stable (black arrows).

$\Delta npr1$  presents a high sensitivity to toxic cations such as  $\text{Li}^+$  or hygromycin B.<sup>7</sup>

We observed that Npr1 is essential to maintain Ynt1 levels in nitrate and under nitrogen deprivation. Using the  $\Delta end4$  and  $\Delta vps27$  mutants involved in intracellular protein traffic, we showed that in the strain lacking Npr1, Ynt1 was routed to the vacuole from the later biosynthetic pathways and the plasma membrane. Therefore, Npr1 is involved in regulating Ynt1 levels by acting on both *de novo* synthesized Ynt1 present in the secretion pathway and that already in the plasma membrane. Furthermore, the following two experiments shed light on the poor growth of  $\Delta npr1$  in low nitrate; (i) the amount of Ynt1 was found to be lower in  $\Delta npr1$  after incubation in nitrate for 2 h, and (ii) the kinetics of Ynt1 reaching the plasma membrane was slower in  $\Delta npr1$  than in WT (Fig. 2C).

The negative effect observed in  $\Delta npr1$  on the levels of Ynt1 raises the question of the molecular mechanisms involved. The fact that Ynt1 was rapidly degraded in  $\Delta npr1$  at the same rate as the unphosphorylatable Ynt1<sup>2S→A</sup> form strongly suggests that Npr1 is involved in phosphorylation of Ynt1. The use of strains overexpressing or lacking Npr1 clearly reveals that Npr1 is involved in the observed phosphorylation of Ynt1, which in turn takes place at Ser-244 and Ser-246. However, unlike CHL1 (7, 8, 44), Ynt1 phosphorylation does not seem to be involved in nitrate affinity changes or nitrate signaling. Overexpression of Npr1, by increasing the *NPR1* copy number, causes an atypical phosphorylation of Ynt1, which takes place even in good nitrogen sources, unlike WT (Fig. 3C). This phosphorylation is not due to greater Ynt1 stability, because a highly stable nonubiquitinatable form of Ynt1, namely Ynt1<sup>3K→R</sup> (11), was not phosphorylated in good nitrogen sources, unlike *nNPR1* strain. Our data contrast with those observed in *S. cerevisiae* Gap1, which is unphosphorylated and unstable in  $\Delta npr1$ ; however, the increased stability of Gap1 because of *RSP5* deletion causes the reappearance of Gap1 phosphorylation (15). This indicates that Npr1 phosphorylation is indirect. Using synthetic peptides, a (K/R)XXS(K/R) consensus sequence for the Npr1 phosphorylation site was found (45). This site is present in Ynt1 (Ser-246). However, in *S. cerevisiae*, Bul proteins, components of the *RSP5* ubiquitin ligase complex, contain several perfect Npr1 consensus phosphorylation motifs (Bul1, <sup>51</sup>KGSSR<sup>55</sup>, <sup>319</sup>KVKSK<sup>323</sup>, and <sup>849</sup>KQHSK<sup>853</sup>, and Bul2, <sup>446</sup>KRTSK<sup>450</sup>) (45). Moreover, *in vitro* and *in vivo* findings strongly suggest that the phosphorylation state and activity of the  $\alpha$ -arrestin Aly2, involved in the intracellular traffic of Gap1, are directly regulated by Npr1 (46). Therefore, despite the presence of a putative Npr1 phosphorylation site in Ynt1, it seems that in general Npr1 does not phosphorylate the target permease it regulates.

Concerning the relationship between Npr1 and Ynt1 ubiquitinylation, the disruption effect of *NPR1* was not reversed by Ynt1<sup>2S→L</sup> (Fig. 4A), in which phosphorylation is functionally and constitutively mimicked by mutating Ser residues to Asp (12). This suggests that Npr1 acts beyond Ynt1 phosphorylation and that Npr1 is probably not directly involved in Ynt1 phosphorylation. In turn, the nonubiquitinatable Ynt1<sup>3K→R</sup> overcomes the effect of *NPR1* deletion on Ynt1 degradation, pointing to a link between Npr1 and Ynt1 ubiquitinylation (Fig. 4A). Consistent with this, deletion of *NPR1* causes an increment

### Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

in the Ynt1 ubiquitin conjugates, even in nitrogen starvation where Ynt1 is highly stable (Fig. 4B). Furthermore, overexpression of *NPR1* protects Ynt1 from ubiquitinylation, even in good nitrogen sources. As our results show that the increase in Npr1 led to high Ynt1 phosphorylation and low ubiquitinylation, and completely the opposite when *NPR1* was disrupted, at first glance it could be thought that phosphorylation blocks ubiquitinylation of Ynt1. However, we have not found any evidence for this. In fact, the opposite seems to be the case, because Ynt1<sup>2S→E</sup> was degraded in a  $\Delta npr1$  mutant (Fig. 4A), unlike the WT strain, and the nonphosphorylatable form of Ynt1<sup>2S→A</sup> does not increase ubiquitinylation (Fig. 4B). Therefore, it can be concluded that the phosphorylation state of Ynt1 itself is not involved in regulating its ubiquitinylation, suggesting that Npr1 could be phosphorylating some auxiliary protein such as arrestin-related or ubiquitin-ligase adaptors or Bul1 or Bul2 (45–47), which could be hindering Ynt1 ubiquitinylation. The involvement of Npr1 in Ynt1 ubiquitinylation raises the question of the role of the ubiquitin ligase Rsp5 in this process. However, a thermo-sensitive *rsp5-1* mutant in *H. polymorpha* affected Gap1 (supplemental Fig. S2) and the high affinity  $\text{K}^+$  transporter Hak1 degradation<sup>6</sup> but not Ynt1. To rule out the role of Rsp5 in Ynt1 ubiquitinylation, further experiments should be undertaken. *DOA4* encodes for a deubiquitinating enzyme required for ubiquitin homeostasis in yeast (48, 49); its disruption does not affect Ynt1 down-regulation, unlike Gap1 (supplemental Fig. S2). However, as above, we cannot rule out the possibility of Ynt1 undergoing ubiquitinylation in  $\Delta doa4$ .

Carbon starvation also leads to a rapid decrease of Ynt1 levels. Most likely this obeys a general program to adapt cell enzymatic machinery to the adverse nutritional state. In *S. cerevisiae*, carbon or nitrogen starvation induces degradation of the tryptophan permease Tat2 and uracil permease Fur4 (23, 24). Rapamycin also produces Tat2 degradation (23). We should highlight that although the precise reason why Ynt1 is degraded in response to carbon starvation is uncertain, apparently the mechanism involved is the same as when cells are transferred from nitrate to glutamine (11).

We also studied Npr1 phosphorylation in response to nitrogen sources and carbon and  $\text{K}^+$  starvation. In glutamine or other preferred nitrogen sources and in carbon starvation, Npr1 is highly phosphorylated, although in nitrogen limitation conditions or in nonpreferred nitrogen sources this phosphorylation almost disappears. In contrast to Npr1, Ynt1 was phosphorylated in nitrogen-free medium and nonphosphorylated in good nitrogen sources and carbon starvation (Figs. 6 and 7). In *S. cerevisiae*, Npr1 phosphorylation is dependent on the TOR signaling pathway; thus, rapamycin blocks this phosphorylation in good nitrogen sources (21, 28). However, HpNpr1 phosphorylation in good nitrogen sources is not affected by rapamycin, despite it causing de-repression of the genes subjected to nitrogen catabolite repression (6). It also does not block Ynt1 degradation in response to glutamine (Fig. 6C). However, the effect of rapamycin on plasma membrane permeases is controversial. It has been shown that Gap1 is stable in rapamycin (23). However, when cells are grown in a sublethal concentration of rapamycin, Gap1 levels were greatly reduced, and this is explained by the increase in the internal concentration of

## Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

amino acids (50). A striking difference in the response of Npr1/Ynt1 to carbon starvation, unlike glutamine addition, is that rapamycin prevents Npr1 dephosphorylation, leading to a lower Ynt1 degradation rate. Therefore, it seems that in *H. polymorpha* the intracellular traffic of Ynt1 elicited by carbon starvation is regulated by the rapamycin-sensitive TOR complex. Nevertheless, it cannot be ruled out that an insensitive TOR complex could also be involved in the case of glutamine. Alternatively, under nutrient stress, like that produced by carbon starvation, rapamycin-sensitive TOR complex could be more essential for endocytosis and protein trafficking, thus affecting Ynt1 degradation (29). It is noteworthy that under these conditions, HpNpr1 phosphorylation is also impeded by rapamycin (Fig. 7D). In preferred nitrogen sources, Npr1 responded to K<sup>+</sup> starvation with a higher degree of phosphorylation (Fig. 8), although no changes were observed in nonpreferred nitrogen sources. However, we observed no significant changes either in phosphorylation or stability of Ynt1. However, in K<sup>+</sup> starvation, nitrate uptake was significantly reduced (Fig. 8). This could be due in part to the plasma electrochemical potential alteration, although a sound conclusion on the effect of K<sup>+</sup> starvation on Ynt1 would need further research.

Another unexpected result was that during nitrogen deprivation conditions, Npr1 shows a basal phosphorylation that only disappears when protein extracts are treated with phosphatase (Fig. 6B). This could indicate that some of this Npr1 phosphorylation is nitrogen source-independent, which could explain some phenotypes of the  $\Delta npr1$  mutant not being related to the nitrogen sources, such as Li<sup>+</sup> and hygromycin sensitivity.<sup>7</sup> Npr1 phosphorylation events, up to 22 in *S. cerevisiae* (28), could be involved in regulating Npr1 activity and also in the recognition, binding, and phosphorylation of a broad set of substrates. Consistent with this, in the Saccharomyces Genome Data base, up to 67 records appear so far for *NPR1* genetic or physical interactions.

The current knowledge about the regulation of the yeast high affinity nitrate/nitrite transporter Ynt1 is shown in Fig. 9. In summary, Npr1 plays a pivotal role in regulating Ynt1 levels according to nitrogen and carbon availability.

**Acknowledgments**—F. Machín (Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife) obtained the preliminary evidence on the effect of carbon starvation on Ynt1 while a member of our group. R. González (this laboratory) performed the study on the effect of rapamycin concentration and preincubation time on Ynt1 levels and phosphorylation. We thank Rhein Biotech (Germany) for providing *NPR1*, *END4*, *PEP12*, and *VPS27* DNA sequences. We are grateful to R. Serrano (Valencia, Spain) for *Pma1* antiserum and to Bruno André (Brussels, Belgium) for *Gap1*. We also thank Guido Jones for proofreading the manuscript and Francisco J. Navarro (Rockefeller University) for critical reading and valuable suggestions.

## REFERENCES

- Siverio, J. M. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 277–284
- Crawford, N. M., and Arst, H. N., Jr. (1993) *Annu. Rev. Genet.* 27, 115–146
- Cooper, T. G. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 223–238
- Llana, A., Igeho, M. I., Galván, A., and Fernández, E. (2002) *Plant J.* 30, 261–271
- Narendja, F., Goller, S. P., Wolschek, M., and Strauss, J. (2002) *Mol. Microbiol.* 44, 573–583
- Navarro, F. J., Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machín, F., Guillén, R. M., Lancha, A., and Siverio, J. M. (2003) *FEMS Yeast Res.* 4, 149–155
- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C., and Tsay, Y. F. (2009) *Cell* 138, 1184–1194
- Hu, H. C., Wang, Y. Y., and Tsay, Y. F. (2009) *Plant J.* 57, 264–278
- Machín, F., Medina, B., Navarro, F. J., Pérez, M. D., Veenhuis, M., Tejera, P., Lorenzo, I. I., Lancha, A., and Siverio, J. M. (2004) *Yeast* 21, 265–276
- Pérez, M. D., González, C., Avila, J., Brito, N., and Siverio, J. M. (1997) *Biochem. J.* 321, 397–403
- Navarro, F. J., Machín, F., Martín, Y., and Siverio, J. M. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 13268–13274
- Navarro, F. J., Martín, Y., and Siverio, J. M. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 31208–31217
- Wang, Y., Li, W., Siddiqi, Y., Kinghorn, J. R., Unkles, S. E., and Glass, A. D. (2007) *New Phytol.* 175, 699–706
- Wirth, J., Chopin, F., Santoni, V., Viennois, G., Tillard, P., Krapp, A., Lejay, L., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 23541–23552
- De Craene, J. O., Soetens, O., and Andre, B. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 43939–43948
- Grenson, M., and Acheroy, B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 188, 261–265
- Grenson, M. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133, 141–144
- Kacuass, M., Gamache, I., Ramotar, D., Audette, M., and Poulin, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2109–2117
- Omura, F., and Kodama, Y. (2004) *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 227–234
- Boeckstaens, M., André, B., and Marini, A. M. (2007) *Mol. Microbiol.* 64, 534–546
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., and Hall, M. N. (1998) *EMBO J.* 17, 6924–6931
- Neuhäuser, B., Dunkel, N., Satheesh, S. V., and Morschhäuser, I. (2011) *Eukaryot. Cell* 10, 332–342
- Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M. N. (1999) *J. Cell Biol.* 146, 1227–1238
- Volland, C., Urban-Grimal, D., Gérard, G., and Haguener-Tsapis, R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9833–9841
- Persson, B. L., Lagerstedt, J. O., Pratt, J. R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., and Lundh, F. (2003) *Curr. Genet.* 43, 225–244
- Lagerstedt, J. O., Zvyagilskaya, R., Pratt, J. R., Pattison-Granberg, J., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., and Persson, B. L. (2002) *FEBS Lett.* 526, 31–37
- Martinez, P., Zvyagilskaya, R., Allard, P., and Persson, B. L. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 2253–2256
- Gander, S., Bonenfant, D., Altermatt, P., Martin, D. E., Hautri, S., Moes, S., Hall, M. N., and Jenoe, P. (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 3743–3753
- Aronova, S., Wedaman, K., Anderson, S., Yates, J., 3rd, and Powers, T. (2007) *Mol. Biol. Cell* 18, 2779–2794
- Devasahayam, G., Ritz, D., Helliwell, S. B., Burke, D. J., and Sturgill, T. W. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17840–17845
- Neufeld, T. P. (2007) *Cell Metab.* 5, 3–5
- Wedaman, K. P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., 3rd, McCaffery, J. M., and Powers, T. (2003) *Mol. Biol. Cell* 14, 1204–1220
- Zurita-Martinez, S. A., Puria, R., Pan, X., Boeke, J. D., and Cardenas, M. E. (2007) *Genetics* 176, 2139–2150
- Pérez Valle, J., Jenkins, I. L., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R., and Yenush, L. (2007) *Mol. Cell Biol.* 27, 5725–5736
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., and Riezman, H. (1993) *J. Cell Biol.* 120, 55–65
- Piper, R. C., Cooper, A. A., Yang, H., and Stevens, T. H. (1995) *J. Cell Biol.* 131, 603–617
- Avila, J., Pérez, M. D., Brito, N., González, C., and Siverio, J. M. (1995) *FEBS Lett.* 366, 137–142
- Wang, G., Yang, J., and Huibregtse, J. M. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19, 342–352
- Belgareh-Touzé, N., Léon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M.,

***Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels***

- Urban-Grimal, D., and Haguenuer-Tsapis, R. (2008) *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 791–796
40. Estrella, L. A., Krishnamurthy, S., Timme, C. R., and Hampsey, M. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 5327–5334
41. Felice, M. R., De Domenico, I., Li, L., Ward, D. M., Bartok, B., Musci, G., and Kaplan, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 22181–22190
42. Rodriguez, C., Tejera, P., Medina, B., Guillén, R., Domínguez, A., Ramos, J., and Siverio, J. M. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 37551–37560
43. Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., and Portillo, F. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 7654–7661
44. Liu, K. H., and Tsay, Y. F. (2003) *EMBO J.* **22**, 1005–1013
45. Gander, S., Martin, D., Hauri, S., Moes, S., Poletto, G., Pagano, M. A., Marin, O., Meggio, F., and Jenoe, P. (2009) *J. Proteome Res.* **8**, 5305–5316
46. O'Donnell, A. F., Apffel, A., Gardner, R. G., and Cyert, M. S. (2010) *Mol. Biol. Cell* **21**, 3552–3566
47. Lin, C. H., MacGurn, J. A., Chu, T., Stefan, C. J., and Emr, S. D. (2008) *Cell* **135**, 714–725
48. Swaminathan, S., Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 2583–2594
49. Papa, F. R., and Hochstrasser, M. (1993) *Nature* **366**, 313–319
50. Chen, F. J., and Kaiser, C. A. (2003) *J. Cell Biol.* **161**, 333–347

#### 4. Estudio de otros mediadores de la señal de nitrógeno

Varios trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio se han centrado en la identificación de nuevos mediadores de la desrepresión e inducción de la vía de asimilación de nitrato. Con ese objetivo se aislaron una serie de mutantes afectados en la señalización de la vía de asimilación de nitrato obtenidos mediante mutagénesis química con el agente alquilante etil metano sulfonato (EMS). Tras la complementación funcional con una genoteca de *H. polymorpha*, el aislamiento y la secuenciación de los plásmidos se identificaron las ORF responsables de la complementación de los mutantes (Guillén, 2006; Tejera, 2003). Una de las ORF presentó una elevada similitud a PTEN, uno de los genes supresores de tumores cuya mutación aparece frecuentemente asociada al cáncer humano. Los resultados expuestos en este capítulo se obtuvieron en colaboración con E. Cabrera y Y. Martín.

##### 4.1 Caracterización preliminar de Tep1

La mutagénesis con EMS se llevó a cabo sobre una cepa portadora de la fusión *YNRI-lacZ* denominada PTC2. Dichos mutantes se seleccionaron por la alteración de la expresión del gen reportero en presencia de nitrato y se analizaron en cuanto a su actividad nitrato reductasa. Se obtuvieron tres tipos de mutantes: carentes de actividad  $\beta$ -galactosidasa y valores de actividad NR del 5-16%, con niveles de actividad NR menores a los presentes en la cepa WT (30-68%) y con niveles superiores (124-185%). Tras la complementación funcional con la genoteca de *H. polymorpha* construida en el plásmido PYT3 y el aislamiento y secuenciación de los plásmidos aislados se identificaron las ORF responsables de la complementación de los mutantes. Los mutantes carentes de actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron complementados únicamente por plásmidos portadores de los genes *YNA1* e *YNA2* recuperando su capacidad para generar colonias azules en medio con X-gal y nitrato, lo que hizo pensar que éstos eran los únicos factores implicados en el proceso de inducción. Debido a la dificultad para seleccionar mutantes complementados mediante rastreo por colonias azules en el resto de casos, se optó por analizar la tolerancia de los mismos a diversos compuestos. El mutante PTRG19<sub>78</sub>, con niveles de actividad NR del 50 %, presentó además sensibilidad a Li<sup>+</sup>. Los transformantes complementados recuperaron la tolerancia a Li<sup>+</sup>. Tras la extracción del plásmido responsable de la complementación funcional y su

secuenciación se identificaron varias ORF. Una de ellas presentó homología con el gen humano *PTEN*. La ORF se denominó *TEP1* (figura 64), nombre que recibe el ortólogo de *PTEN* en *S. cerevisiae*. La expresión de *TEP1* en PTRG19<sub>78</sub> restauró la tolerancia a  $\text{Li}^+$ , la actividad NR y los niveles de excreción de nitrito.

La caracterización inicial de *Tep1* en *H. polymorpha* permitió dilucidar su participación en la asimilación de nitrato. La menor expresión del gen *YNR1*, característica del mutante  $\Delta tep1$  en nitrato, fue suprimida por completo con el empleo de rapamicina. Las evidencias obtenidas sugerían que la mutación del gen *TEP1* producía una activación *per se* de TOR, aun en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno, presumiblemente favoreciendo la localización citosólica de *Gat1* y *Gat2* resultando en una disminución en la transcripción de los genes estructurales de la vía de asimilación de nitrato (Guillén, 2006). Por otra parte la caracterización de *Tep1* también puso de manifiesto su participación en la tolerancia a sales.  $\Delta tep1$  presentó concentraciones intracelulares de  $\text{Li}^+$  superiores a la cepa silvestre tanto en los experimentos de entrada como de salida del catión.



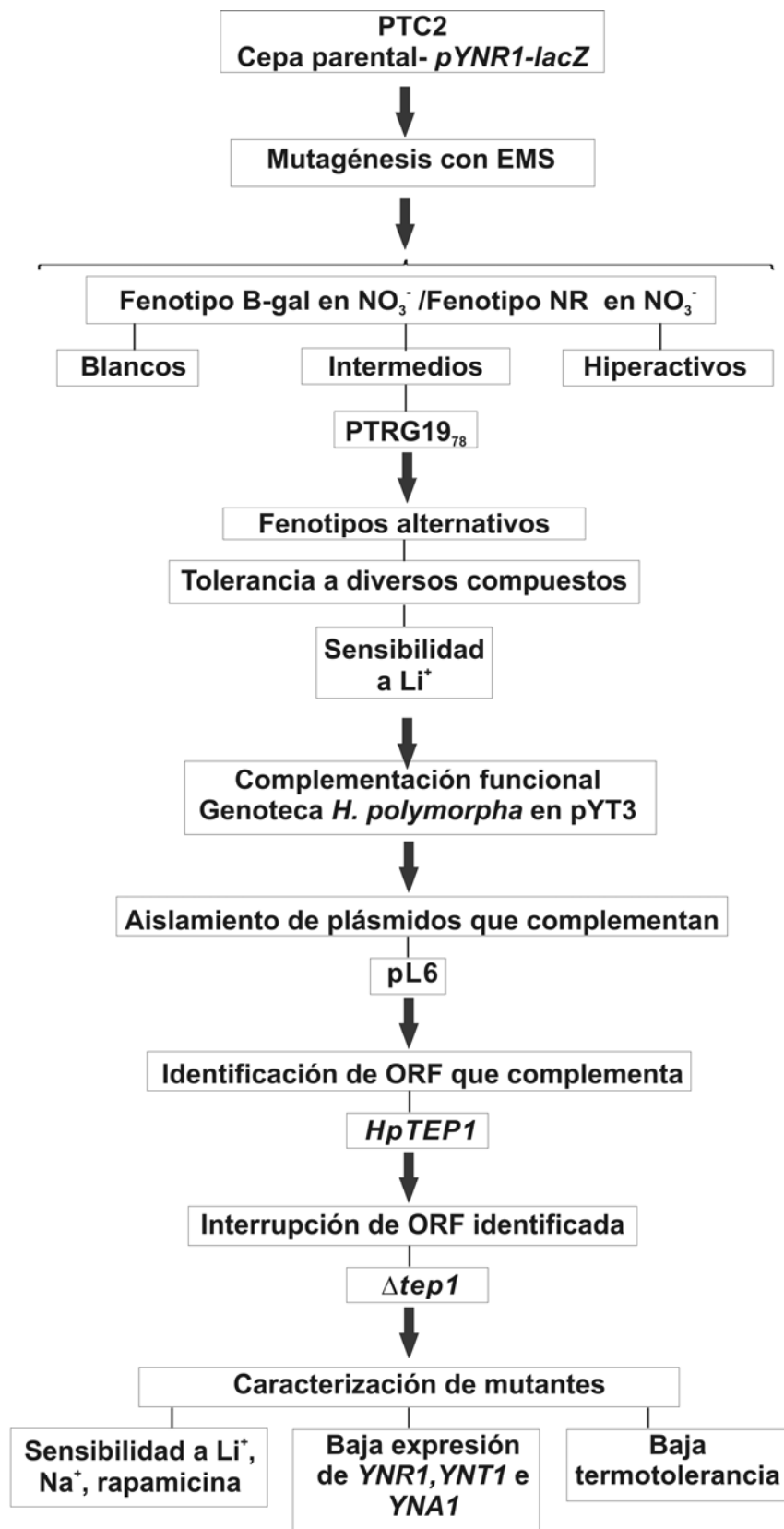


Figura 64. Estrategia empleada en el aislamiento de genes implicados en la señalización de la vía de asimilación de nitrato.

En el caso de mamíferos, se sabe que PTEN está deletado o inactivado en muchos tipos de tumores, incluyendo cáncer de endometrio, pecho, próstata y melanoma. PTEN es una fosfatasa de fosfatidilinositoles con especificidad de hidrólisis del fosfato ubicado en la posición 3 del anillo del inositol (Cantley y Neel, 1999). Mediante la conversión del fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>) en fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, antagoniza la actividad de la kinasa PI3 (PI3K). Su inactivación produce una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT y de la señalización mediada por mTOR (Manning *et al.*, 2005) (figura 65).

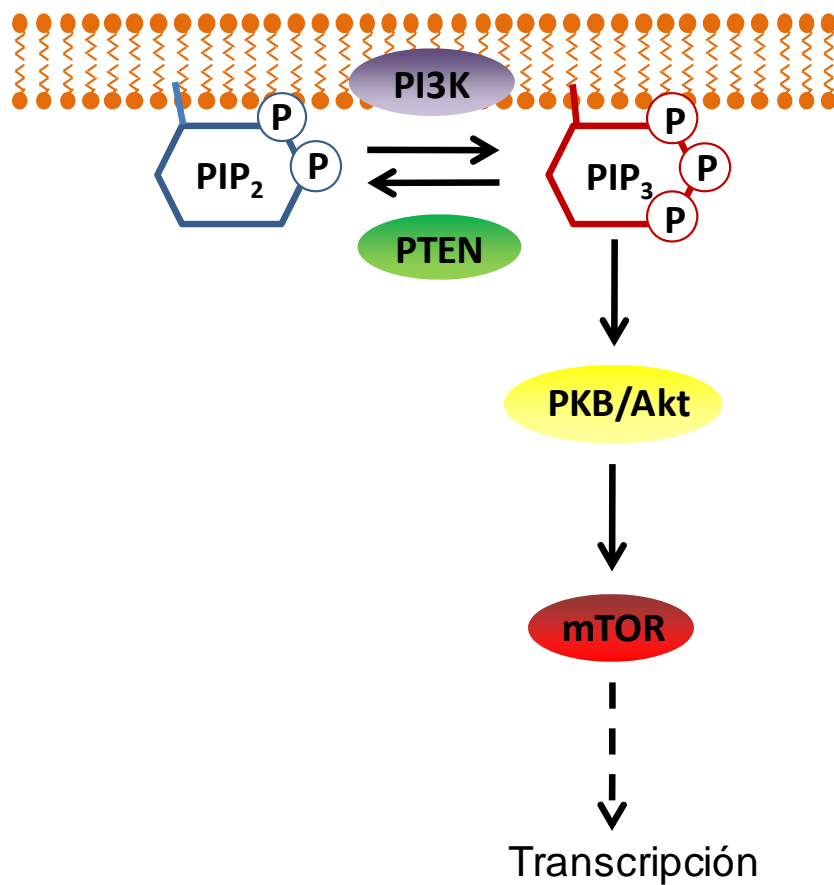
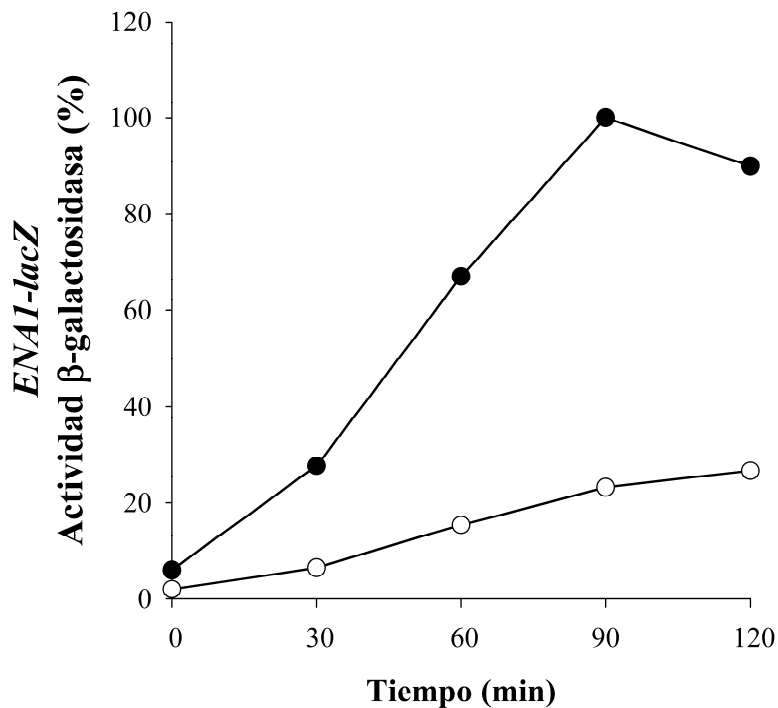


Figura 65. Relación de PTEN y TOR en mamíferos.

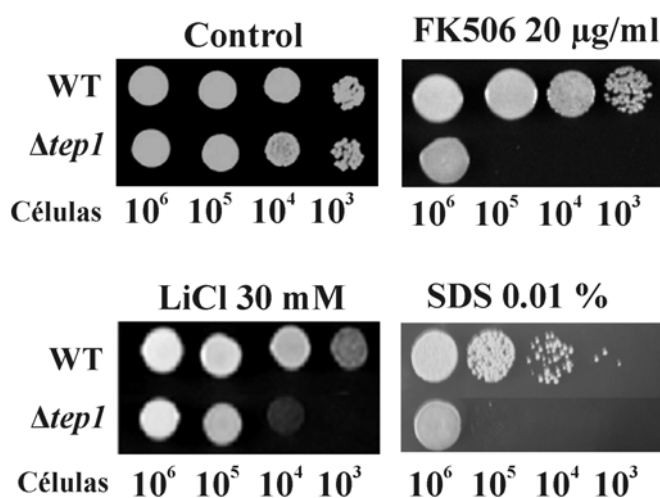
## 4.2 Papel de Tep1 en la tolerancia a sales

La caracterización preliminar de Tep1 puso de manifiesto su participación en la tolerancia a sales (Guillén, 2006).  $\Delta tep1$  mostró sensibilidad a  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ .  $\Delta tep1$  presentó concentraciones intracelulares de  $\text{Li}^+$  superiores a la cepa silvestre. Tal como se ha indicado con anterioridad, esta característica puede deberse a una mayor entrada de  $\text{Li}^+$ , o bien a un defecto en los sistemas de salida. Esta última opción parece verse apoyada por el comportamiento del mutante en los experimentos de salida, donde se observa un retraso en la salida del catión. Por ese motivo analizamos la expresión del gen *ENAI* en el mutante  $\Delta tep1$ . Los resultados obtenidos mostraron que la cepa  $\Delta tep1$  presentaba niveles inferiores de expresión del gen en comparación con la cepa silvestre (figura 66). Por tanto, la expresión disminuida de *ENAI* es la responsable de la salida más lenta de  $\text{Li}^+$ , de la acumulación de concentraciones intracelulares tóxicas y de la sensibilidad del mutante.



**Figura 66. Expresión de *ENAI* en las cepas WT y  $\Delta tep1$ .** La expresión de *ENAI* se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT y  $\Delta tep1$  que portan la construcción *ENAI-lacZ*. Las células se crecieron en amonio. Se determinó la expresión de *ENAI* en la cepa WT (●) y  $\Delta tep1$  (○) incubadas en NaCl 0.7 M durante 120 min. Se representa los valores obtenidos en un experimento representativo de 3 independientes.

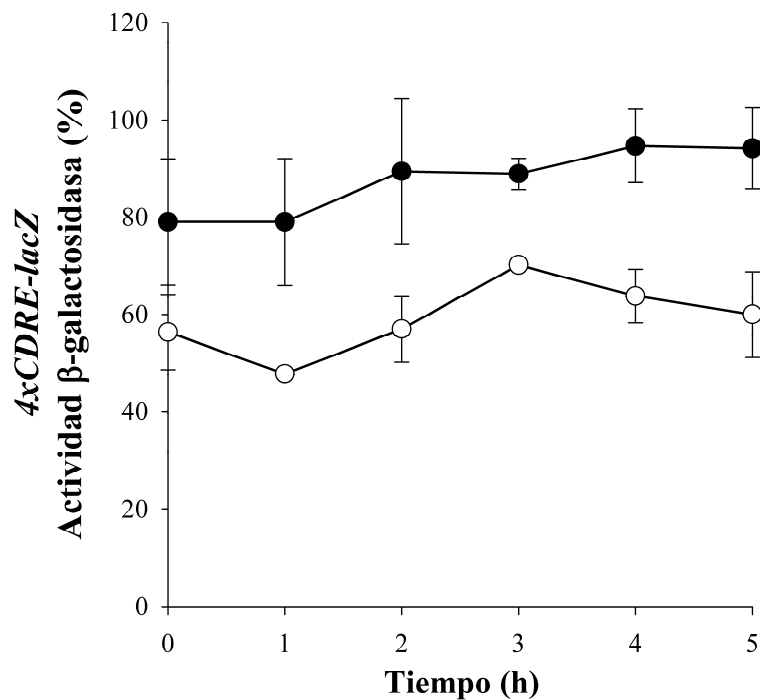
Los resultados descritos hasta el momento mostraban un paralelismo fenotípico entre  $\Delta ure2$  y  $\Delta tep1$ . Como se estableció en el capítulo 2, la baja expresión de *ENA1* en  $\Delta ure2$  se debe a una menor activación de la calcineurina. Por ello, decidimos analizar el estado de activación de la calcineurina en  $\Delta tep1$ . En primer lugar, analizamos la sensibilidad del mutante  $\Delta tep1$  al inhibidor específico de la calcineurina FK506.  $\Delta tep1$  mostró una pronunciada sensibilidad al macrólido (figura 67). Este resultado sugería que Tep1 tiene un efecto positivo sobre la activación de la calcineurina. De acuerdo con dicha hipótesis, se observó asimismo sensibilidad frente a SDS en  $\Delta tep1$ , fenotipo compartido por la cepa  $\Delta cnb1$  (figura 67).



**Figura 67.  $\Delta tep1$  es sensible a FK506,  $\text{Li}^+$  y SDS.** Las cepas WT y  $\Delta tep1$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris pH 5,5 con FK506, LiCl y SDS a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 días.

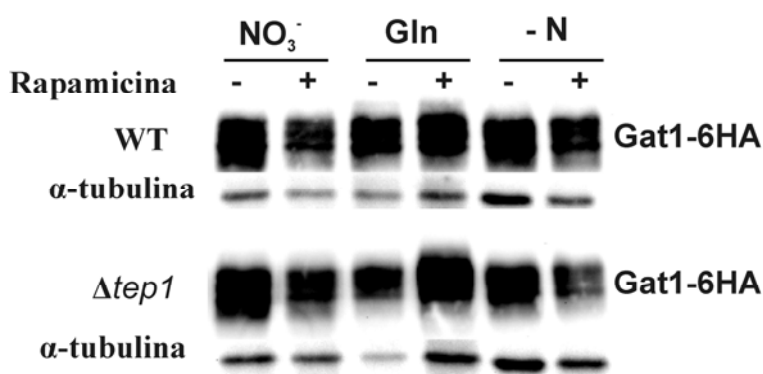
En segundo lugar, medimos la expresión dependiente de calcineurina en  $\Delta tep1$ .  $\Delta tep1$  mostró niveles de expresión *4xCDRE-lacZ* ligeramente inferiores a la cepa WT, en respuesta a  $\text{Na}^+$ , existiendo cierta inducción de la expresión durante las primeras horas (figura 68). Las evidencias obtenidas sugerían que la activación de la calcineurina podría estar afectada en  $\Delta tep1$ , al igual que en  $\Delta ure2$ . Puesto que, tal como se ha descrito en capítulos anteriores la calcineurina regula la expresión génica en *H. polymorpha* a través de Gat1, era posible que los niveles del factor transcripcional estuviesen disminuidos en  $\Delta tep1$ . Sin embargo, al analizar los niveles de Gat1 en  $\Delta tep1$  observamos que éstos no están modificados en  $\Delta tep1$  (figura 69). Este resultado contradecía las evidencias previas que apuntaban a una menor activación de la

calcineurina en  $\Delta tep1$  como la sensibilidad a FK506. Sin embargo, otra posible explicación para este fenotipo es que la combinación de la pérdida de actividad calcineurina y la mutación de *TEP1*, viables cada una de ellas por separado, conduzca a la pérdida de viabilidad. Es lo que se conoce como sintéticos letales. Este resultado nos hizo pensar que era posible que Tep1 no tuviera un efecto positivo sobre la activación de la calcineurina y, en consecuencia, sobre los niveles de Gat1 sino sobre la localización celular de Gat1. Así en ausencia de *TEP1*, Gat1 se encontraría mayoritariamente en el citosol, lo que explicaría los menores niveles de expresión de *ENAI* y de *YNRI*. Esta hipótesis está de acuerdo con las evidencias que apuntan a la existencia de una activación *per se* de TOR en  $\Delta tep1$ .



**Figura 68. Efecto de la delección de *TEP1* sobre la transcripción dependiente de calcineurina.** La transcripción dependiente de calcineurina se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas WT (●) y  $\Delta tep1$  (○) que portan la construcción *4xCDRE-lacZ*. Las células se crecieron en amonio, se recogieron y se resuspendieron en el mismo medio con NaCl 0.7 M incubándose durante 5 horas. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

Esta nueva hipótesis planteaba además una nueva incógnita: ¿participa TOR en la regulación postraduccional de Gat1?. La modificación en el patrón de fosforilación de Gat1 podría influir en la localización celular de Gat1. Con el fin de contrastar esta hipótesis comparamos los niveles de Gat1 en la cepa WT y  $\Delta tep1$  en presencia y ausencia de rapamicina. Sin embargo, el uso de rapamicina no nos permitió detectar cambios importantes en la movilidad electroforética de Gat1 (figura 69). Este resultado podría significar que TOR controla la localización celular de Gat1 modulando únicamente el estado de fosforilación de Ure2 (Capítulo 1).

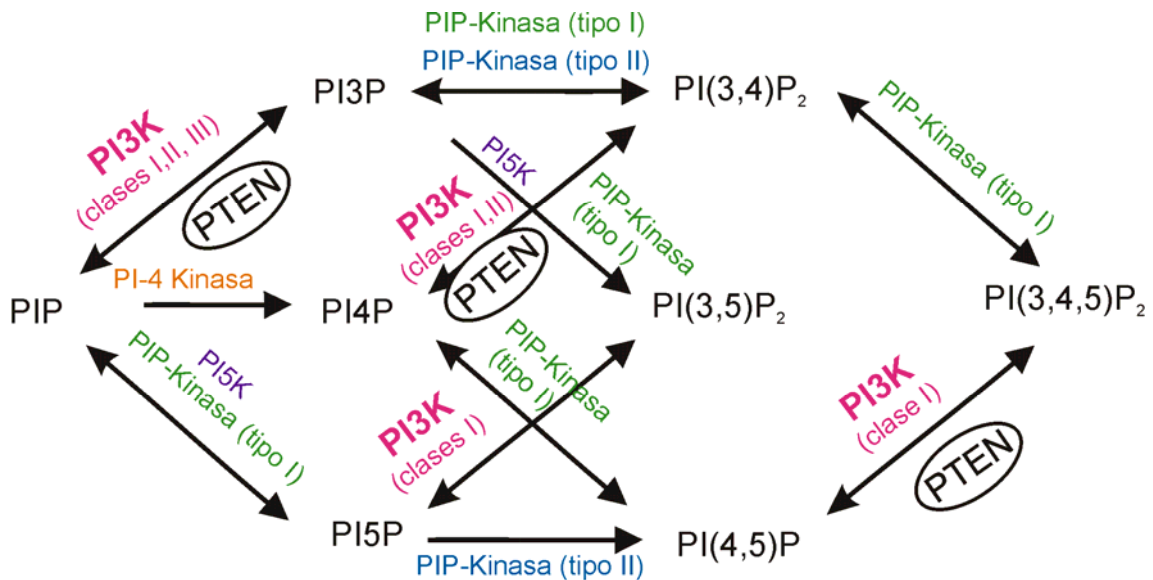


**Figura 69. La delección de *TEP1* no afecta a los niveles de Gat1.** Los niveles de Gat1-6HA se analizaron mediante SDS-PAGE en células crecidas en amonio, lavadas e incubadas durante 120 min en medio con glutamina 5 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM o  $\text{NaNO}_3$  1 mM con o sin rapamicina. Se analizaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína. La tubulina se utilizó como control de carga.

#### 4.3 *Tep1* altera los niveles de fosfoinosítidos.

Funcionalmente, PTEN es una fosfatasa que presenta actividad dual sobre proteínas y también sobre fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ). PTEN antagoniza la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K). PI3K cataliza la conversión del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ( $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ), un segundo mensajero que promueve la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular. PTEN, hidroliza específicamente el fosfato de la posición 3 de  $\text{PIP}_3$ , generando  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  (Ali *et al.*, 1999; Goberdhan y Wilson, 2003). Aunque el principal sustrato de PTEN *in vivo* es  $\text{PIP}_3$ , PTEN puede desfosforilar también a  $\text{PI}(3)\text{P}$  y  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ . En *S. pombe*, se ha detectado  $\text{PIP}_3$  y se ha descrito que el ortólogo de PTEN, *ptn1*, es capaz de hidrolizar 3-fosfoinosítidos (Mitra *et al.*, 2004). En esta levadura, la síntesis de

PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y de PI(3,4)P<sub>2</sub> requiere la fosfoinosítido 3-kinasa de la clase III, vps34. Por su parte, en *S. cerevisiae*, donde esta actividad no se descarta, la cepa mutante tan sólo presenta fenotipos leves en cepas diploides homocigóticas como resistencia a la wortmanina, inhibidor de la PI3K, y a Li<sup>+</sup> (Heymont *et al.*, 2000).



**Figura 70. Biosíntesis de los fosfoinosítidos en mamíferos.** Los fosfoinosítidos se encuentran virtualmente en todas las membranas celulares, predominantemente en la cara interna de la membrana plasmática. Éstos pueden ser fosforilados/desfosforilados en las posiciones 3, 4, 5 del anillo de inositol por diversas kinasas y fosfatasa de lípidos que resultan en la generación de siete fosfoinosítidos diferentes. La clase 1 de las PI3K puede fosforilar la posición 3 de PIP, PI4P o PI(4,5)P<sub>2</sub>, para producir PI3P, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> respectivamente. PTEN es capaz de desfosforilar la posición 3 de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI3P y por tanto antagoniza las reacciones catalizadas por esta clase de PI3K.

La comparación de la secuencia aminoacídica de HpTep1, a través del programa BLASTX, reveló que dicha proteína presenta el mayor porcentaje de identidad (un 35%) con PTEN de humanos. Los porcentajes de identidad con ptn1 de *S. pombe* y Tep1 de *S. cerevisiae* son de 33% y 26%, respectivamente. El alineamiento realizado con ayuda del programa ClustalW entre la proteína HpTep1 y PTEN de *H. sapiens*, mostró que la región de máxima similitud entre estas proteínas corresponde principalmente al dominio fosfatasa.

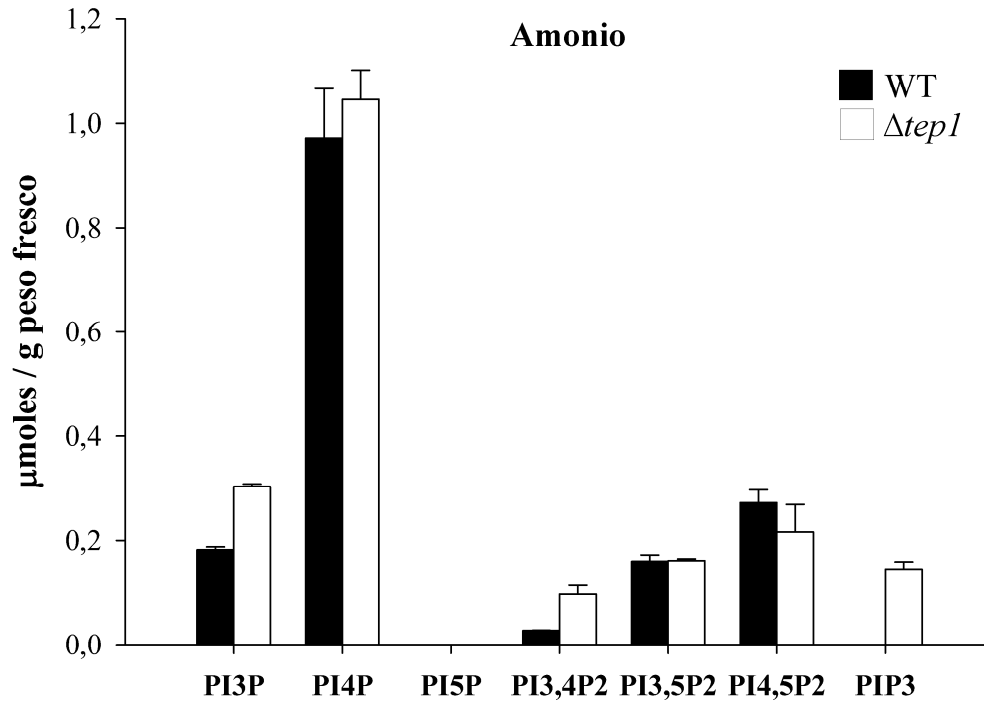
Dada la elevada similitud de HpTep1 con PTEN y ptn1, ambas con actividad fosfatasa sobre lípidos, nos propusimos determinar la posible actividad fosfatasa sobre lípidos de HpTep1, así como la identificación de sus sustratos. Para ello, determinamos los niveles de fosfoinosítidos en las cepas WT y  $\Delta tep1$  incubadas en amonio. Los fosfoinosítidos se extrajeron mediante el método de extracción ácida de lípidos descrito por Cho y Boss en 1992. La separación cromatográfica de los lípidos se realizó de acuerdo a König *et al*, 2008. PIP<sub>3</sub> fue sólo detectable en  $\Delta tep1$  (figura 71A). De acuerdo con los elevados niveles de PIP<sub>3</sub> en  $\Delta tep1$ , esta cepa presentó menores niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> en comparación a la cepa WT. La cepa  $\Delta tep1$  presentó además niveles superiores de PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3)P. Sin embargo, el incremento en los niveles de PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3)P no se vio acompañado de un descenso en los niveles de PI(4)P (figura 69A) y PIP (no mostrado). Estos resultados sugieren que Tep1 desfosforila a PIP<sub>3</sub>, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3)P y que, por tanto, presenta actividad fosfatasa sobre lípidos. Podemos concluir que Tep1 es el ortólogo de PTEN en *H. polymorpha*.

Con el fin de estudiar el efecto del nitrato sobre la actividad de Tep1 se realizaron los mismos experimentos en nitrato (figura 71B). Los niveles de PIP<sub>3</sub> nuevamente fueron detectables únicamente en  $\Delta tep1$ . Dichos niveles fueron superiores a los existentes en amonio. De acuerdo con este hecho, también los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> disminuyeron en mayor medida en  $\Delta tep1$  en nitrato respecto a amonio. La delección de Tep1 también provocó un mayor incremento de los niveles de PI(3,4)P<sub>2</sub> en nitrato respecto a amonio. Puesto que los niveles de PIP<sub>3</sub> no se han detectado en la cepa WT ni en nitrato ni en amonio desconocemos el efecto del nitrato sobre los mismos en presencia de Tep1. Sin embargo, si comparamos los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> en la cepa silvestre en amonio y nitrato (figura 71C) se observan mayores niveles en nitrato. Por tanto, es de esperar que la cepa silvestre contenga niveles inferiores de PIP<sub>3</sub> en nitrato. Por tanto, los resultados sugieren que existe una correlación entre los niveles de PIP<sub>3</sub> y la expresión de *YNRI*. Así, la ausencia de *TEPI* provoca la acumulación de PIP<sub>3</sub> así como una menor expresión de *YNRI*, mientras que el nitrato promueve la acumulación de PI(4,5)P<sub>2</sub> y una mayor expresión de *YNRI*. De acuerdo con esta hipótesis se observa que el nitrato induce la expresión de *TEPI* (Guillén, 2006). Por tanto, el nitrato induciría la expresión de *TEPI* que desfosforilaría a PIP<sub>3</sub> dando lugar a la acumulación de PI(4,5)P<sub>2</sub>. Los menores niveles de PIP<sub>3</sub> inhibirían la señalización mediada por TOR (mediante una vía aún por determinar, que pudiera ser similar a la descrita en

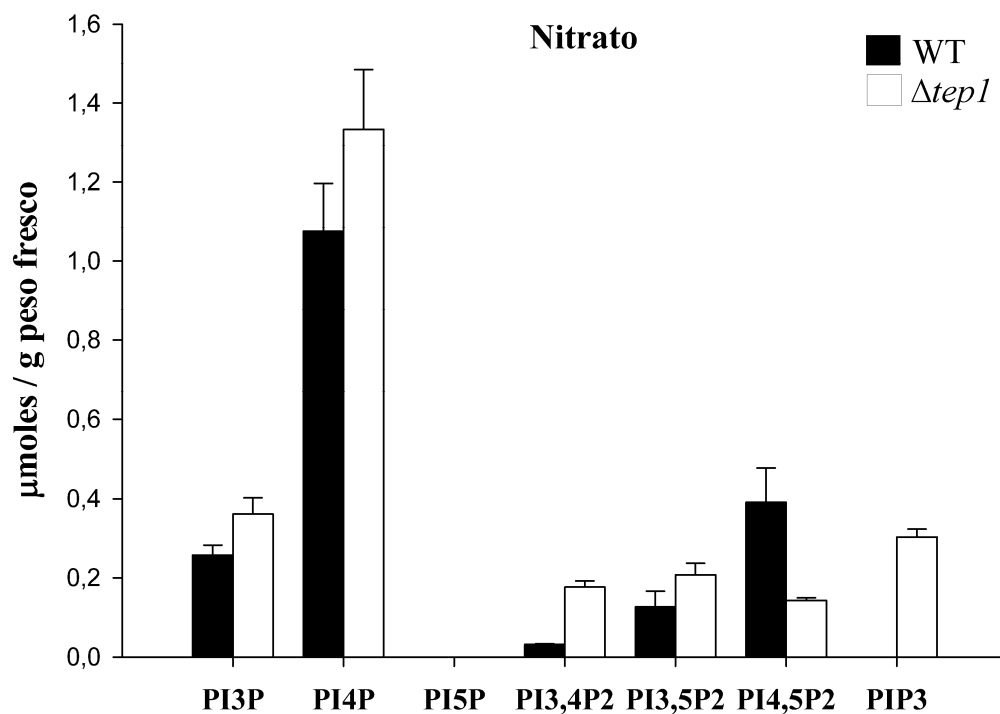


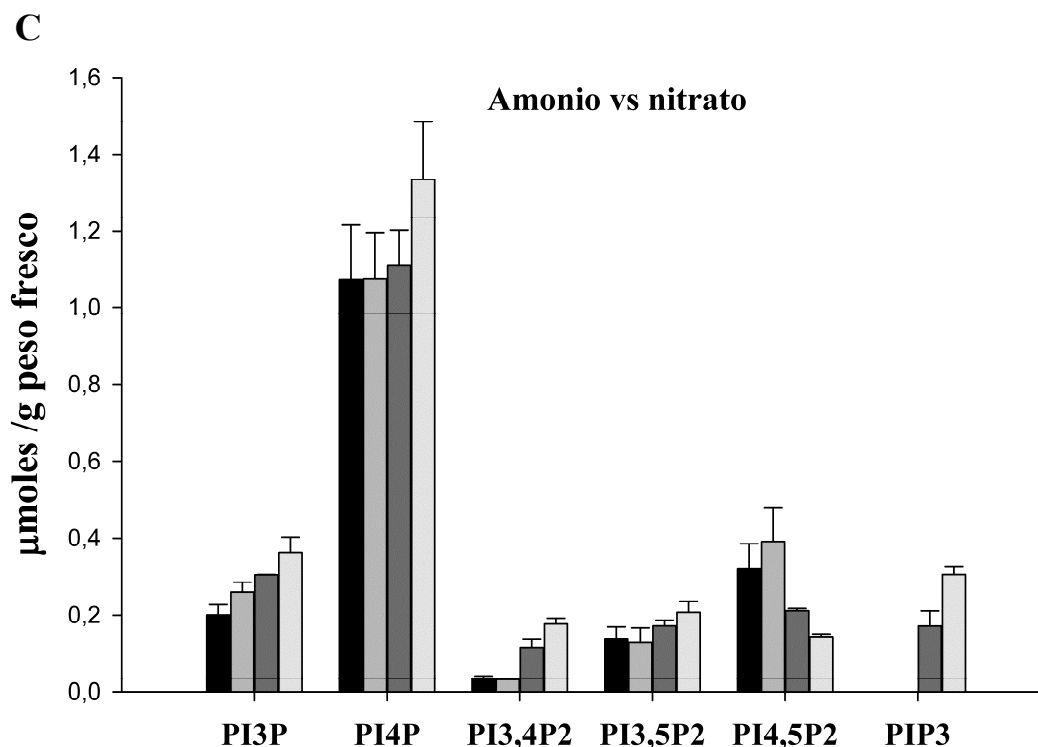
mamíferos) y, en consecuencia, la desrepresión de los genes de asimilación de nitrato, entre ellos *YNR1*. En  $\Delta tep1$ , por su parte, se produciría el incremento en los niveles de PIP<sub>3</sub>, una mayor activación de TOR y, como resultado, una menor expresión de *YNR1*.

**A**



**B**



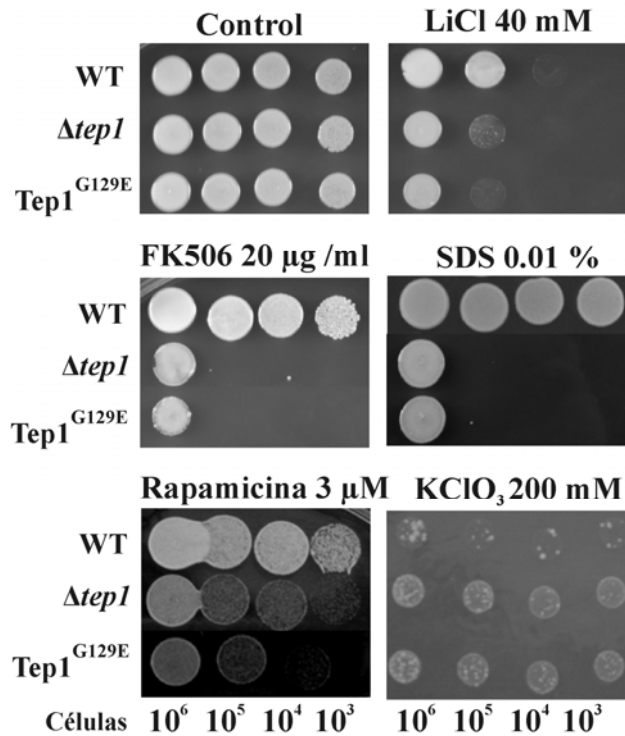


**Figura 71. Niveles de fosfoinosítidos en las cepas WT y  $\Delta tep1$ .** **A. Niveles en amonio.** Las células se crecieron en amonio 3 mM hasta una  $DO_{660}$  de 1 y se recogieron mediante centrifugación. **B. Niveles en nitrato.** Las células se crecieron en amonio 3 mM hasta una  $DO_{660}$  de 1, se añadió 1 mM de nitrato, se incubaron durante 6 horas y se recogieron por centrifugación. **C. Niveles en amonio versus nitrato.** De izquierda a derecha: WT en amonio, WT en nitrato,  $\Delta tep1$  en amonio,  $\Delta tep1$  en nitrato. Tras la extracción ácida de los lípidos se llevó a cabo su separación cromatográfica. Los valores representan la media de 2 experimentos independientes, en cada uno de los cuales se realizaron 2 réplicas.

#### 4.4 Papel de la actividad fosfatasa sobre lípidos de Tep1

La proteína mutante en humanos  $PTEN^{G129E}$  es incapaz de desfosforilar fosfatidilinosítoles mientras que la proteína  $PTEN^{C124S}$  pierde tanto su actividad fosfatasa sobre lípidos como sobre proteínas. Con el fin de profundizar en la importancia de la actividad fosfatasa sobre lípidos sobre la función de Tep1 se llevó a cabo mutagénesis dirigida sobre los residuos conservados de glicina y de cisteína de las posiciones 129 y 124. La cepa portadora de la mutación  $Tep1^{G129E}$  mostró los mismos fenotipos que los presentados por el mutante  $\Delta tep1$  como sensibilidad a  $Li^+$ , FK506, SDS, rapamicina y tolerancia a clorato (figura 72). La pérdida de la actividad fosfatasa

sobre proteínas no incrementó la sensibilidad a dichos compuestos. Este resultado confirma que la actividad fosfatasa sobre lípidos es esencial en la función de Tep1, tal como ocurre con PTEN en humanos. Así la pérdida de la actividad fosfatasa sobre lípidos es la responsable de los fenotipos de  $\Delta tep1$ .



**Figura 72. Análisis fenotípico de la cepa  $Tep1^{G129E}$ .** Las cepas WT,  $\Delta tep1$  y  $Tep1^{G129E}$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS con LiCl, FK506, SDS, rapamicina y en  $NaNO_3$  5 mM más prolina 1 mM con  $KClO_3$  a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

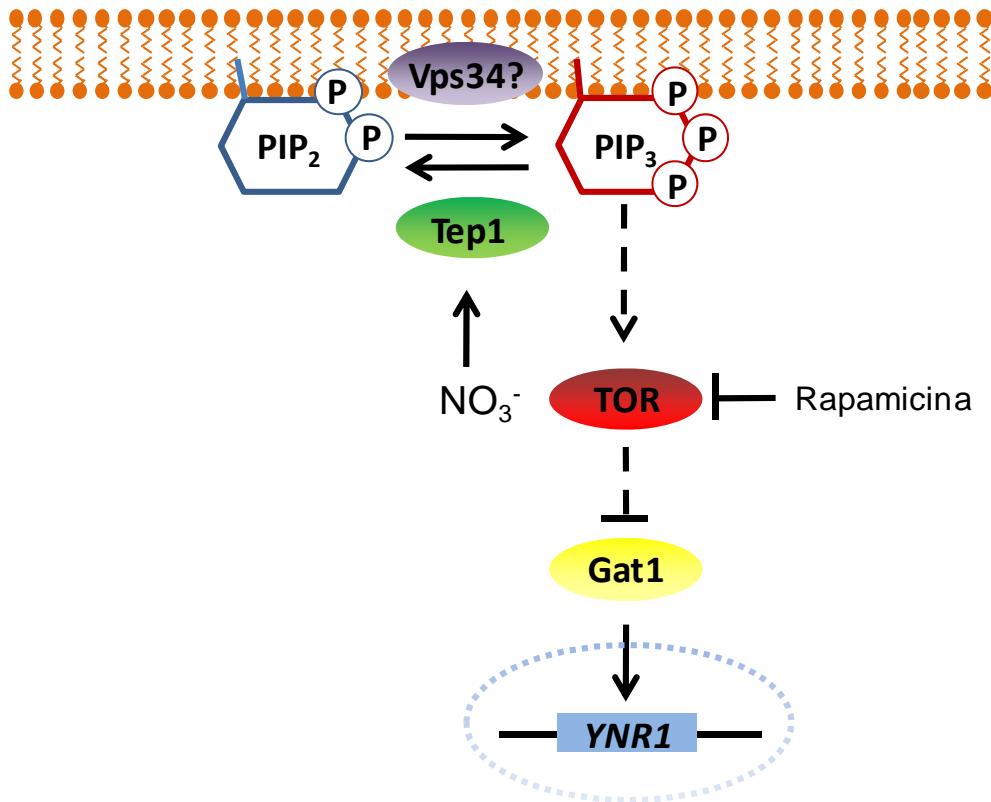
Por tanto, la actividad fosfatasa sobre lípidos de Tep1 no sólo está involucrada en la activación de TOR y el control de la expresión de los genes sensibles a RCN sino en su papel en la tolerancia a sales.

## SINOPSIS

Los resultados expuestos en el presente capítulo ponen de manifiesto que *HpTEP1* es el homólogo de PTEN. Tep1 conserva todos los residuos esenciales para la actividad fosfatasa y presenta un porcentaje de identidad del 35 % con PTEN. Además las células carentes de *TEP1* muestran un marcado incremento en los niveles de PI(3,4)P<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub> y PI3P. Por último, la mutación puntual (G129E) que elimina la actividad fosfatasa en PTEN hace que la cepa se comporte como un mutante  $\Delta tep1$ . Basándonos en estas evidencias podemos concluir que Tep1 tiene actividad fosfatasa sobre lípidos y que regula los niveles de PI(3,4)P<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub> y PI3P. La observación de que la cepa silvestre tenga niveles indetectables de PIP<sub>3</sub> y casi indetectables de PI(3,4)P<sub>2</sub> indica que, tal como ocurre en células de mamíferos, estos lípidos están estrechamente regulados en *H. polymorpha*. Dicha regulación podría ocurrir a nivel de la síntesis y/o degradación de estos lípidos. Aquí se ha mostrado que Tep1 podría tener un papel importante en mantener bajos niveles de PI(3,4)P<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub> y PI3P.

La delección de *TEP1* provocó la aparición de múltiples fenotipos como sensibilidad a rapamicina, Li<sup>+</sup>, FK506, SDS y tolerancia a ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Lo mismo se observó en la cepa portadora de una copia del gen *TEP1* con la mutación puntual G129E, conocida por eliminar la actividad fosfatasa sobre lípidos de PTEN. Este hecho revela que PIP<sub>3</sub> y PI(3,4)P<sub>2</sub> al igual que en células de mamíferos podrían tener múltiples funciones, regulando diferentes procesos celulares en diferentes regiones de la célula.

Asimismo estos fenotipos muestran la existencia de algunas similitudes y diferencias de Tep1 con Ure2. Una de las similitudes la encontramos en su papel en la respuesta frente a estrés salino. La delección de ambos genes tiene como consecuencia la mayor acumulación de Li<sup>+</sup> debido a la menor expresión de *ENAI*. Sin embargo, mientras que en  $\Delta ure2$  la menor expresión de *ENAI* se debe a los bajos niveles de Gat1, los niveles del factor transcripcional no se ven modificados en  $\Delta tep1$ , lo que sugiere que en esta última la localización celular de Gat1 es mayoritariamente citosólica. Esta hipótesis está de acuerdo con los datos que apuntan a que la mutación de *TEP1* produce una activación “per se” de TOR, aun en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno y, por tanto, favorecería la localización citosólica de Gat1 resultando en una disminución en la transcripción de los genes estructurales de la vía de asimilación de nitrato, como *YNR1* así como en la transcripción de *ENAI*.



**Figura 73. Modelo de la relación de Tep1 y la señalización mediada por TOR.** El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induce la expresión de *TEP1* que desfosforila PIP<sub>3</sub>. La disminución en los niveles de PIP<sub>3</sub> inhibe finalmente a TOR lo que permite la entrada de Gat1 en el núcleo y la inducción de *YNR1*. La ausencia de *TEP1* provoca la acumulación de PIP<sub>3</sub> y, como consecuencia, la activación de TOR que impide la entrada de Gat1 en el núcleo por lo que la expresión de *YNR1* disminuye.

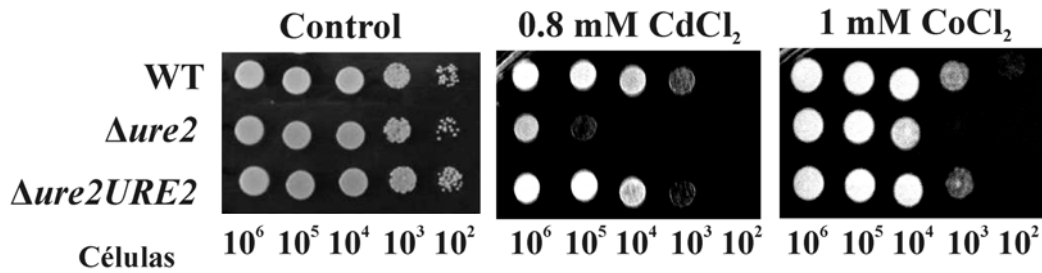
## 5. Papel de Ure2 en los procesos de detoxificación

*HpUre2, al igual que ScUre2, presenta similitud con glutatión S-transferasas de diferentes organismos. En el capítulo 2, se mostró que el crecimiento de  $\Delta ure2$  se ve inhibido en presencia de  $Cd^{2+}$ . Este hecho nos condujo a profundizar en el papel de Ure2 en los procesos de detoxificación.*

### 5.1 Ure2 participa en la detoxificación de metales pesados

La toxicidad de los metales pesados se debe a su unión a los grupos sulfidrilos de las proteínas lo que conduce a la pérdida de su estructura y la inhibición de su actividad (Hall, 2002; Perego y Howell, 1997). Los mecanismos a través de los cuales las células se protegen de los metales son muy complejos. En el caso concreto del  $Cd^{2+}$ , el mecanismo general de detoxificación tanto en *S. cerevisiae* como en mamíferos engloba su unión al tripéptido glutatión (GSH) y la expulsión de los complejos GSH-metal. La unión del  $Cd^{2+}$  al GSH es catalizada por las glutatión S-transferasas. En *S. cerevisiae*, los complejos bis(glutionato)cadmio ( $Cd-[GS]_2$ ) son eliminados del citosol y transportados al interior de la vacuola por la ATPasa Ycf1. En mamíferos los GS-conjugados pueden ser bombeados al exterior celular por el transportador MRP (multidrug resistance-associated protein).

Para estudiar la posible implicación del HpUre2 en la detoxificación de metales pesados optamos en primer lugar por una aproximación genética al problema, es decir, estudiamos el fenotipo de sensibilidad de  $\Delta ure2$  frente a varios metales. El mutante  $\Delta ure2$  mostró sensibilidad a  $Cd^{2+}$  y a  $Co^{2+}$  (figura 74). Este resultado indica que HpUre2 participa en la detoxificación de  $Cd^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , al igual que ScUre2.

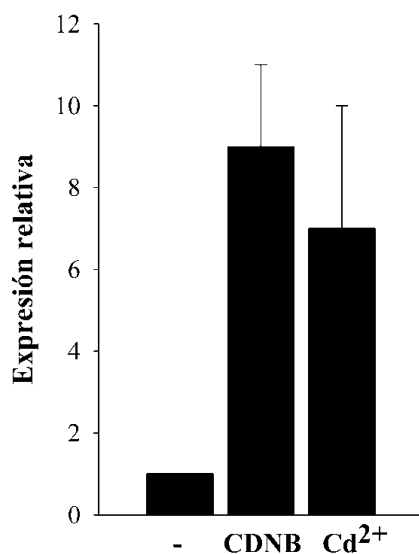


**Figura 74.  $\Delta ure2$  es sensible a  $Cd^{2+}$  y  $Co^{2+}$ .** Las cepas WT,  $\Delta ure2$  y  $\Delta ure2URE2$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris, pH 5,5 con  $CdCl_2$  y  $CoCl_2$  a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a  $37^\circ C$  durante 2 días.

Puesto que Ure2 regula negativamente a los factores transcripcionales GATA, la sensibilidad observada en  $\Delta ure2$  podría deberse a la regulación directa o indirecta por los factores GATA de uno o más genes involucrados en la defensa celular frente a metales pesados. De acuerdo con la implicación de los factores GATA en detoxificación, las cepas  $\Delta gln3$  y  $\Delta gat1$  presentan sensibilidad a  $Cd^{2+}$  aunque menor que la presentada por  $\Delta ure2$  (Medina, 2008). Estos resultados sugieren que tanto Ure2 como Gat1 y Gln3 podrían participar conjuntamente en la detoxificación del cadmio. Así estos factores GATA podrían participar en la activación de la expresión de un transportador homólogo a Ycf1 en *H. polymorpha*. Esto explicaría la sensibilidad a cadmio de  $\Delta gln3$  y  $\Delta gat1$ .

## 5.2 El cadmio y el CDNB inducen la expresión de *HpURE2*

Una vez realizado el estudio fenotípico, quisimos comprobar si el  $Cd^{2+}$  así como el CDNB y el  $H_2O_2$  inducían la expresión del gen *HpURE2*. Para ello determinamos la expresión de este gen mediante qRT-PCR en una cepa silvestre incubada durante 2 horas en presencia y ausencia de  $Cd^{2+}$ , CDNB y  $H_2O_2$ . El tratamiento con cadmio (4 mM) produjo una fuerte activación de la transcripción de *HpURE2*. La incubación con CDNB (0.35 mM), sustrato modelo de las GST, también resultó en un incremento en la expresión (figura 75) de *URE2*. Con respecto al tratamiento con  $H_2O_2$  no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión.



**Figura 75. Análisis de la expresión del gen *HpURE2*.** Los resultados muestran la expresión relativa del gen *HpURE2* en una cepa silvestre y en  $\Delta ure2$  determinada mediante qRT-PCR. Las células se crecieron en amonio y se resuspendieron en medio fresco donde se incubaron durante 2 horas en ausencia de tóxico (-) o en presencia de 0.35 mM de CDNB o 4 mM de  $CdCl_2$ . Los resultados representan la media de dos experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

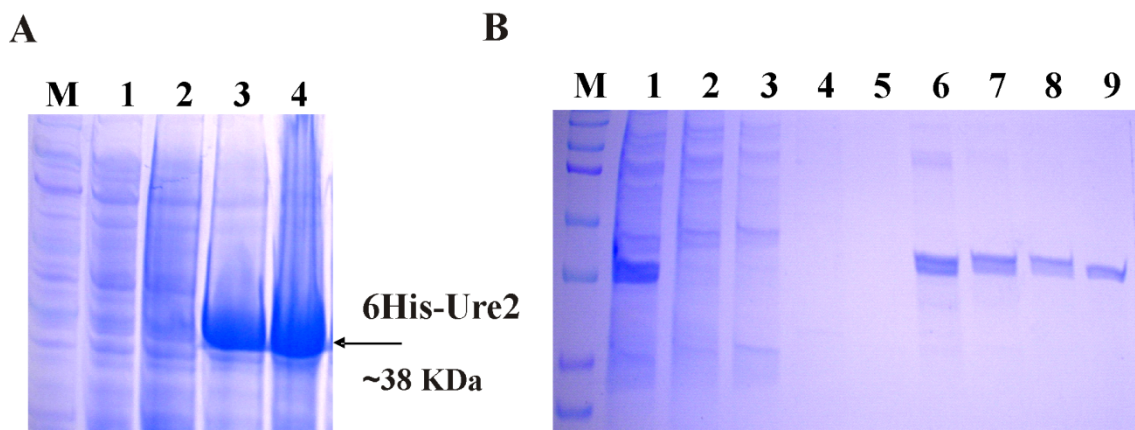
De acuerdo con la inducción de la expresión de *URE2* en presencia de CDNB es importante señalar que la expresión en *A. nidulans* de *gstA*, gen con elevada similitud a *URE2*, también se vio activada en presencia de este compuesto. *gstA* codifica una GST perteneciente a la clase theta, si bien no está implicada en la regulación del metabolismo del nitrógeno (Fraser *et al.*, 2002).

### 5.3 Ure2 presenta actividad glutatión S-transferasa frente al ácido etacrínico

Dado los resultados obtenidos con respecto a la inducción de la expresión de *HpURE2* por parte del CDNB y del  $Cd^{2+}$ , en este punto nos propusimos testar la actividad GST de Ure2 *in vitro*. Para ello usamos como sustratos el CDNB y el ácido etacrínico, derivado del ácido fenoxicético.

Para medir esta actividad, la proteína Ure2 fue producida en *Escherichia coli* con una cola de polihistidina en su extremo N-terminal para su purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel (Material y Métodos. Apartado 6.7.1). La purificación de la proteína Ure2 se comprobó mediante SDS-PAGE al 12% y tinción con Coomassie Blue al 0.05 % (figura 76). La cuantificación de la proteína purificada se llevó a cabo según el método descrito por Bradford (1976) usando  $\gamma$ -globulina como patrón.





**Figura 76. Expresión y purificación de la proteína Ure2. (A) Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de Ure2 en *E. coli*.** Los carriles 1 y 2 corresponden a las muestras no inducidas. Los carriles 3 y 4 corresponden con las muestras inducidas con IPTG. Se observa claramente como en las muestras inducidas aparece una banda de masa molecular esperada (~ 38 KDa). **(B) Análisis mediante SDS-PAGE del proceso de purificación de la proteína Ure2 mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel.** La muestra 1 corresponde al sobrenadante tras la rotura celular. La muestra 2 corresponde al eluido de la fijación a la columna. Se puede observar que la eficiencia de unión a la columna ha sido buena. Las muestras 3,4 y 5 corresponden a los eluidos con el tampón de lavado. Las muestras 6, 7, 8 y 9 corresponden a los eluidos con el tampón de elución. Se observa claramente una banda mayoritaria correspondiente a la proteína Ure2 purificada.

La GST cataliza la conjugación del GSH al CDNB a través del grupo tiol del GSH. El producto de la reacción, el conjugado GS-DNB absorbe a 340 nm. El incremento en la absorción es directamente proporcional a la actividad GST.



En el caso del ácido etacrínico el producto de la reacción absorbe a 270 nm. Por tanto, las reacciones se siguieron mediante el aumento de la absorbancia a 340 nm (en el caso del CDNB) y a 270 nm (en el caso del ácido etacrínico). En los dos casos se realizó un blanco sin proteína para sustraer a la absorbancia medida en presencia de Ure2 la absorbancia debida a la autoxidación del GSH. La actividad GST se determinó usando 0.1 mM de ácido etacrínico o 1 mM de CDNB y unos coeficientes de extinción molar de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Sólo se detectó actividad GST en

presencia de ácido etacrínico siendo los valores obtenidos consistentes con los observados para otras enzimas relacionadas (tabla 1). En este caso cuando se añadió proteína Ure2 al resto de los componentes del ensayo se observó un incremento significativo en la absorbancia a 270 nm. Cuando el GSH fue omitido del ensayo no se detectó actividad GST.

Sustrato	Actividad GST ( $\mu\text{moles} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$ )
CDNB	ND
Ácido etacrínico	$0.245 \pm 0.034$

**Tabla 1. Actividad glutatión S-transferasa de Ure2 hacia CDBN y ácido etacrínico.** La actividad se midió *in vitro* utilizando proteína purificada. La mezcla de reacción contiene 1 mM de GSH, 1 mM de CDBN o 0.1 mM de ácido etacrínico en tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,5. La reacción se disparó con la adición del ácido. Se muestra la actividad media de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar en  $\mu\text{moles}$  de S-conjugado  $* \text{min}^{-1} * \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>. CDBN, 1-cloro, 2,4-dinitrobenceno.

Por tanto, HpUre2 presenta actividad GST frente al ácido etacrínico. Es la primera vez que se asocia una actividad GST típica a esta proteína. La incapacidad de medir la actividad GST de ScUre2 puede deberse a la falta de un ensayo enzimático apropiado. Sin embargo, la ausencia de ciertos residuos aminoacídicos implicados en esta actividad en ScUre2 no puede ser descartada. ScUre2 ha sido clasificada dentro de la clase theta de GST atendiendo a la desviación de menos de 6 residuos con respecto a una secuencia consenso que establece un total de 35 restricciones en el extremo N-terminal (Rossjohn, *et al.*, 1996). El análisis detallado de las secuencias de ambas proteínas comparándolas con la secuencia consenso de la clase theta de las GST (figura 77) muestra que:

Los residuos correspondientes en ScUre2 se mantienen a excepción de dos posiciones. Uno es el residuo 71 del consenso (una tirosina) que corresponde a la His187 en ScUre2. Este residuo está en la hélice  $\alpha_3$  de Ure2 e interacciona con la cadena lateral del Asp 170 que está en la lámina  $\beta_3$ . En *Arabidopsis thaliana* que conserva esta tirosina consenso se observa una interacción similar con un aspartato en  $\beta_3$ . Por ello, esta desviación del consenso podría no ser importante.

La segunda desviación se sitúa en la posición 9 de la secuencia consenso que es una serina, pero la correspondiente posición en ScUre2p es la Ala122. Se sabe que esta serina está implicada en estabilizar el anión tiolato. La mutación de esta serina por alanina en la GST de *A. thaliana* (perteneciente a la clase theta) no sólo reduce la actividad a menos del 0.5% sino también reduce significativamente la afinidad por el GSH inmovilizado. En otras clases, el grupo hidroxilo de una tirosina conservada sirve para estabilizar el anión tiolato. ScUre2 también carece también de esa tirosina.

La ausencia de actividad podría deberse a una inserción de una alanina por serina en la posición 122 de ScUre2. Adyacente a la Ala122 está la Ser121. Sin embargo, la cadena lateral de este residuo no está bien posicionada para interactuar con GSH y mucho menos para estabilizar el anión tiolato. En las GST de *E. coli* no están presentes ni la serina ni la tirosina. Se propone que los residuos importantes son la Cys 10 y la His106. Por tanto, la posibilidad de que ScUre2 contenga un nuevo par de residuos catalíticos no puede ser descartada.

Por su parte, HpUre2 carece de la serina 9 del patrón. En su lugar se sitúa la Ala 67. Al igual que ocurre en ScUre2, parece existir una inserción de una alanina en la posición 67 de HpUre2 puesto que junto a la alanina se encuentra la serina 66. La segunda desviación del patrón consenso se sitúa en la posición 81 donde el ácido glutámico ha sustituido a la glicina 23. Finalmente, debemos destacar que HpUre2 conserva la tirosina 71 (Tyr 134) del consenso. Es posible que este residuo sea clave para dicha actividad. Mediante la realización de mutagénesis dirigida sobre la Tyr 134 y la medida de la actividad GST en la versión mutada de HpUre2 podríamos determinar la importancia del mismo.

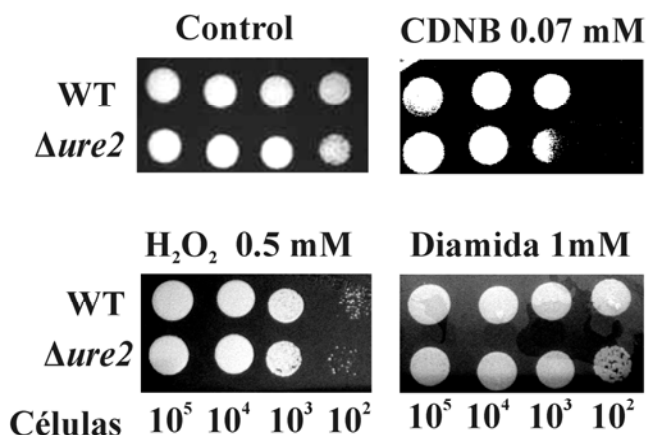


**Figura 77. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de HpUre2, ScUre2 y de una GST de insecto perteneciente a la clase theta.** La secuencia consenso se representa en la figura bajo el alineamiento. \*= residuo hidrofóbico; # = residuo polar; ≈ = NDEQ

#### 5.4 Ure2 presenta actividad glutatión peroxidasa frente a varios hidroperóxidos

Los mutantes con defectos en genes que codifican GST exhiben una mayor sensibilidad no sólo a los sustratos preferentes de las GST sino también a otros compuestos que no son detoxificados por conjugación directa con el glutatión (Rai *et al.* 2003). Dos de estos compuestos son el peróxido de hidrógeno y la diamida. El peróxido de hidrógeno es detoxificado por dos vías: por peroxidación, una actividad encontrada en GST de la clase T en algunos mamíferos y en GST3 de *S. pombe* o por conjugación a GSH de productos celulares que son oxidados por hidrógeno y otros peróxidos (Veal *et al.*, 2002; Tan y Board, 1996; Sherratt *et al.*, 1997). La diamida también oxida proteínas celulares y otros constituyentes, pero además, disminuye la cantidad de glutatión reducido porque es detoxificada vía reducción dependiente de glutatión (Kosower y Kosower, 1997).

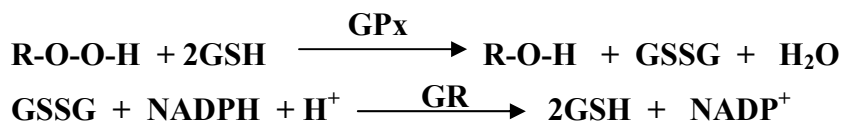
Con el fin de indagar en el papel de Ure2 en la detoxificación celular comparamos la sensibilidad de  $\Delta ure2$  y la cepa silvestre a  $H_2O_2$  y diamida.  $\Delta ure2$  no presentó diferencias significativas de crecimiento respecto a la cepa WT frente a estos compuestos (figura 78). Estos resultados sugerían que HpUre2 no participa en la detoxificación de estos compuestos. De acuerdo con la ausencia de actividad GST frente a CDNB la ausencia de Ure2 tampoco produjo sensibilidad a este compuesto. Sin embargo, recordemos que la expresión del gen *URE2* se indujo fuertemente en una cepa silvestre incubada en presencia de este compuesto. Es importante recordar que idénticos resultados fueron obtenidos con *gstA* en *A. nidulans*, GST de la clase theta, clase que se define, al menos en parte, por falta de actividad frente a este sustrato. Así la fuerte inducción de la transcripción de *URE2* podría deberse a que dicho compuesto es altamente tóxico para la célula con lo que su presencia puede originar este efecto, como respuesta al estrés.



**Figura 78. Crecimiento de  $\Delta ure2$  en CDNB,  $H_2O_2$  y diamida.** Las cepas WT y  $\Delta ure2$  se sembraron en placa mediante goteo en medio YGAS tamponado con MES-Tris, pH 5,5 con los compuestos mencionados a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

A pesar de estas evidencias decidimos medir la actividad glutatión peroxidasa de Ure2. La capacidad de Ure2 para reducir hidroperóxidos se determinó *in vitro* utilizando proteína purificada y varios sustratos. Las reacciones se siguieron mediante el descenso de la absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADPH. La oxidación del

NADPH se acopla a la reacción de reducción de GSSG (glutatión oxidado) a GSH (glutatión reducido) por la glutatión reductasa (GR) lo que hace posible medir esta actividad.



La tasa de oxidación no enzimática del NADPH en ausencia de Ure2 se sustrajo en todos los casos. La actividad GPx se calculó usando un coeficiente de extinción molar de  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Cuando se añadió proteína Ure2 al resto de los componentes del ensayo se observó un incremento significativo en la tasa de oxidación del NADPH (tabla 2). Cuando el GSH fue omitido del ensayo no se detectó actividad glutatión peroxidasa. Ure2 presentó actividad hacia los tres sustratos analizados:  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxido de cumeno (CHP) y tert-butilhidroperóxido (t-BHP) con una preferencia en el orden  $\text{H}_2\text{O}_2 > \text{t-BHP} > \text{CHP}$  (tabla 2).

Sustrato	Actividad GPx ( $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
$\text{H}_2\text{O}_2$	$0.518 \pm 0.048$
CHP	$0.078 \pm 0.009$
t-BHP	$0.139 \pm 0.019$

**Tabla 2. Actividad glutatión peroxidasa de Ure2 hacia diferentes sustratos.** La actividad se midió *in vitro* utilizando proteína purificada. La mezcla de reacción contiene 1 mM de GSH, 4 mM de azida sódica, 0.15 mM de NADPH, 0.24 unidades de glutatión reductasa, 1.2 mM de hidroperóxido de cumeno, 1.2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 5 mM de tert-butilhidroperóxido en 100 mM de tampón fosfato sódico pH 7,5. La reacción se disparó con la adición del sustrato hidroperóxido. CHP, hidroperóxido de cumeno; t-BHP, tert-butilhidroperóxido. Se muestra la actividad media de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Puesto que Ure2 presenta actividad GPx, es posible que la tolerancia de  $\Delta ure2$  a estos compuestos en placa se deba a la participación de otras enzimas en su detoxificación o a la incapacidad de los compuestos para entrar en el interior celular en las condiciones ensayadas. En *S. cerevisiae* se sabe que Ure2 protege a la célula de los compuestos oxidantes no sólo a través de su actividad GPx intrínseca sino regulando, a través de los GATA, la expresión de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa *CIS2*. Este gen codifica la primera enzima en la degradación del glutatión (Springael and Penninckx, 2003). Así, la sensibilidad de *Sc* $\Delta ure2$  a  $H_2O_2$  exógeno se debe a la mayor degradación del GSH como consecuencia de la activación de la transcripción de *CIS2*, mediada por Gat1/Gln3. Por todo ello, sería interesante estudiar la implicación de HpUre2 en la expresión de los genes que regulan el metabolismo del GSH con el fin de profundizar en el papel de HpUre2 y de los GATA en la protección frente al estrés oxidativo en *H. polymorpha*.

## SINOPSIS

En *S. cerevisiae*, Ure2 participa en la resistencia frente a metales pesados y a compuestos causantes de estrés oxidativo. *Sc*Ure2 muestra una elevada similitud a las GST, presenta actividad GPx hacia peróxido de hidrógeno y varios peróxidos orgánicos y actividad GRX. Sin embargo, la actividad GST no ha sido aún detectada. Los resultados presentados en este capítulo muestran que HpUre2 participa en la detoxificación de cadmio y cobalto, presenta actividad GPx frente a los mismos compuestos oxidantes testados en *S. cerevisiae* y, lo que es más importante, presenta actividad GST. La nula actividad frente al CDNB así como la similitud de secuencia parece confirmar la pertenencia de HpUre2 a las GST de la clase theta, clase que se define al menos en parte por la falta de actividad frente al CDNB. HpUre2 mostró además actividad glutatión peroxidasa frente a peróxido de hidrógeno y a otros sustratos hidroperóxidos si bien Hp $\Delta ure2$  no mostró sensibilidad frente a los compuestos oxidantes testados. Con el fin de completar su caracterización enzimática sería interesante determinar la actividad GRX.

La sensibilidad frente a metales pesados es una cuestión compleja. En el caso concreto del  $Cd^{2+}$  se sabe que este metal induce elevados niveles de especies reactivas de oxígeno, lo que podría explicar la mayor expresión de *HpURE2* en presencia de

$\text{Cd}^{2+}$ . La fuerte expresión en presencia de CDNB podría ser igualmente consecuencia del estrés inducido por este compuesto.

De los resultados obtenidos podemos concluir que Ure2 juega un papel central en los procesos de detoxificación celular ejerciendo este papel tanto de forma directa como indirecta. La elucidación de los mecanismos moleculares asociados con cada uno de estos nuevos papeles identificados plantea un nuevo e interesante desafío.



# *Perspectivas*

---

#### IV. PERSPECTIVAS

Cualquier trabajo de investigación genera nuevas preguntas y esta tesis no es una excepción. Algunas de las preguntas tratan de cuestiones concretas pero también de nuevas líneas que explorar. Dentro de las primeras, existen detalles acerca de la fosforilación de HpUre2 que no se resolvieron en este trabajo y que sería interesante conocer. Por ejemplo, en los capítulos 1 y 3 se ha descrito el patrón de fosforilación de HpUre2 en relación a la RCN y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente. Sin embargo, no se han identificado los residuos implicados en la fosforilación. El análisis de la secuencia de HpUre2 mediante el programa NetPhos identifica 17 sitios posibles de fosforilación con una probabilidad superior a 0,5 asociando al residuo con mayor probabilidad, la Ser-63, un sitio de fosforilación para una kinasa específica, la proteína kinasa C. Mediante mutagénesis dirigida se podría explorar éste y otros sitios de fosforilación con alta probabilidad. Por otra parte, tal como se estableció en el apartado 3.6, Ure2 aumenta su movilidad electroforética al ser inducido en altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , efecto que desaparece al eliminar el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio. Este hecho descarta la degradación de la proteína y sugiere la existencia de varios estados de fosforilación de la proteína aunque el uso de  $\lambda$  proteína fosfatasa nos permitió únicamente identificar dos formas de la proteína. Además del incremento de movilidad se detecta una disminución en la cantidad de proteína. Estos resultados sugieren un cambio en la localización celular de HpUre2 que podría, bajo estas condiciones extremas, translocarse al núcleo. Para abordar esta cuestión, como aproximación preliminar, se podrían realizar extractos celulares enriquecidos en fracción nuclear mediante centrifugación diferencial. La desaparición de la proteína en los extractos totales debería ir acompañada de la aparición de proteína en los extractos nucleares. Para estudiar la distribución de HpUre2 dentro de la célula frente a diversas condiciones se podría llevar a cabo asimismo su fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) cuyo uso está ampliamente extendido en distintos organismos con esta finalidad.

En el capítulo 3 se ha descrito que HpUre2 presenta actividad GST frente al ácido etacrínico y GPx frente a varios hidroperóxidos. Un asunto que se podría explorar es la identificación de residuos clave responsables de dichas actividades. Para ello se podría empezar realizando mutagénesis dirigida sobre la Tyr 134 conservada en las GSTs de la clase theta, en HpUre2 y ausente en *S. cerevisiae*. Además, se debería determinar la actividad de ScUre2 frente al ácido etacrínico para descartar que la

ausencia de actividad se deba a la falta de un diseño experimental apropiado. Para ello, se podría llevar a cabo su expresión en *E. coli* al igual que se hizo con HpUre2. Por otra parte se podría determinar si HpUre2 presenta actividad glutaredoxina con el fin de completar su caracterización enzimática.

A lo largo del presente trabajo se ha establecido la relación entre la calcineurina y la asimilación de nitrógeno identificándose nuevos genes regulados por la calcineurina: *HpGAT1*, *HpGAT2*, *YNRI*, *YNTI*. Mediante el uso de microarrays de DNA se podrían comparar de forma masiva los patrones de expresión génica de las cepas WT,  $\Delta ure2$  y  $\Delta cnb1$  en presencia de diferentes fuentes nitrogenadas con el fin de identificar nuevos mediadores de la señal de nitrato relacionados con la calcineurina. Mediante el uso de esta técnica se podría realizar un análisis exhaustivo de la expresión dependiente de calcineurina tras la adición de  $Ca^{2+}$  o  $Na^+$ . Los resultados de estos experimentos contribuirían a una mayor comprensión del papel de la calcineurina en la regulación del metabolismo del nitrógeno en *H. polymorpha*. Finalmente, comparando los patrones de expresión de la cepa WT y la cepa  $\Delta crz1$  se podría determinar la dependencia de la expresión del factor transcripcional HpCrz1.

Otro asunto que se podría explorar es la interacción de Ure2 con los factores transcripcionales GATA. En la elaboración de los diferentes modelos de trabajo, hemos asumido que HpUre2 interacciona directamente con HpGat1 y HpGat2. Sin embargo, no disponemos de ninguna evidencia bioquímica de ello. En futuras investigaciones sería sumamente interesante poder elucidar si nuestras suposiciones son ciertas. Actualmente existen numerosas técnicas que podrían ser apropiadas para este fin como el pull-down. Para ello, se podría etiquetar y producir en bacterias la proteína Ure2 con el epítipo GST, inmovilizarla en columnas de glutatión e incubarla con extractos de células que expresen las versiones fusionadas a 6HA de Gat1 y Gat2. Además se podría intentar definir el dominio de unión de cada una de las proteínas expresando versiones truncadas de las proteínas. También se podría estudiar la distribución celular de los factores GATA dentro de la célula frente a diversas condiciones (amonio, nitrato, altas concentraciones de  $Ca^{2+}$ , de  $Na^+$ ...) mediante su fusión a GFP.

En el capítulo 4 se describió como la ausencia de *TEPI* altera los niveles de fosfoinosítidos por lo que suponemos que Tep1 presenta actividad fosfatasa sobre lípidos. Con el fin de verificar esta hipótesis sería interesante llevar a cabo la expresión de la proteína en bacterias con el fin de medir la actividad fosfatasa frente  $PI(3,4,5)P_3$ ,

P(3,4) y PI3P. En este caso sería conveniente expresar también ptn1 de *S. pombe* como control. Igualmente se podría expresar la proteína Tep1 G129E con el fin de confirmar definitivamente la importancia de este residuo en la actividad fosfatasa sobre lípidos en Tep1. Igual de interesante sería determinar la conexión en *H. polymorpha* entre los niveles de fosfoinosítidos y TOR.

# *Conclusiones*

---

## V. CONCLUSIONES

1. HpUre2 se fosforila en respuesta a fuentes nitrogenadas preferidas y se desfosforila bajo condiciones de ayuno de nitrógeno. La presencia de rapamicina también produce desfosforilación, indicando la participación de la vía TOR en la regulación de la asimilación de nitrógeno en *H. polymorpha*.
2. Ure2 participa en la regulación del potencial electroquímico a través del control transcripcional de la H<sup>+</sup>-ATPasa *PMA1*. Así su ausencia provoca el descenso de la actividad Pma1 y resistencia a higromicina B.
3. HpUre2 regula los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular a través del factor transcripcional HpGat2, que induce la expresión de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa *PMR1*. El contenido de Ca<sup>2+</sup> en el RE-Golgi, que depende de los niveles de Pmr1, modula la entrada extracelular del catión.
3. La calcineurina participa tanto en la desrepresión como en la inducción de los genes de la asimilación de nitrógeno a través de la regulación de los niveles de los factores transcripcionales HpGat1 y HpGat2.
4. La calcineurina participa en la señal de inducción de los genes de la asimilación de nitrógeno controlando los niveles de HpYna2 a través de HpGat2.
5. La calcineurina regula positivamente la expresión de la Na<sup>+</sup>-ATPasa *ENAI* y de los genes responsables de la asimilación de nitrógeno a través de HpCrz1-HpGat1 o HpCrz1.
6. La señal de represión generada por la acumulación de amonio, producto final de la asimilación de nitrato, podría estar mediada por HpGat2 a través del bloqueo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el exterior debida a la mayor expresión de *PMR1*.

- 7.** Las fuentes de nitrógeno alternativas incrementan el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  activando la calcineurina. La calidad de las fuentes nitrogenadas regula el estado de activación de la calcineurina. El  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como segundo mensajero en la asimilación de nitrato actuando tanto sobre la desrepresión como sobre la inducción.
  
- 8.** Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos están involucrados en el estado de fosforilación de Ure2. Los elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos y la activación de la calcineurina podrían inducir indirectamente la desfosforilación de Ure2 y en consecuencia afectar a su interacción con los factores GATA, HpGat1 y HpGat2.
  
- 9.** La alteración de los niveles de fosfoinosítidos, la elevada similitud con PTEN y la presencia de residuos esenciales para la actividad fosfatasa indican que Tep1 posee actividad fosfatasa sobre lípidos, siendo por tanto el ortólogo de PTEN (humano) en *H. polymorpha*.
  
- 10.** La cepa Tep1<sup>G129E</sup>, portadora de la mutación puntual conocida por suprimir la capacidad para desfosforilar sustratos lipídicos en PTEN, reproduce los fenotipos de  $\Delta tep1$ , indicando que la actividad fosfatasa sobre lípidos de Tep1 es la responsable de su función.
  
- 11.** HpUre2 presenta actividad GST frente al ácido etacrínico y GPx frente al sustrato oxidante peróxido de hidrógeno, así como frente a los hidroperóxidos orgánicos hidroperóxido de cumeno y tert-butilhidroperóxido. Ure2 participa en la detoxificación de cadmio y cobalto.

*Materialles  
y Métodos*

---



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Microorganismos utilizados

#### 6.1.1. Cepas bacterianas

- **XL1-Blue<sup>1</sup>**: *recA1 endA1 gyrA96(Nal<sup>r</sup>) thi1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac F'* [*proAB lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]. Utilizada en la amplificación de DNA y en la  $\alpha$ -complementación del gen *lacZ*.
- **DH5 $\alpha$** : ( $\Phi$ 80*dlacZΔM15*) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>) supE44 relA1 deoR Δ(laZYA-argF)* U169. Utilizada en la amplificación de DNA.
- **SCS110**: *rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) F'* [*traD36 proAB lacIqZΔM15*]. Empleada para obtener DNA plasmídico no metilado.
- **BL21(DE3)pLysS**: *F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)*. Empleada en la expresión heteróloga de *HpURE2*.

#### 6.1.2. Cepas de levaduras

Como cepa silvestre se utilizó la cepa *Hansenula polymorpha* NCYC 495 (*syn.* CBS<sub>1976</sub>, ATCC<sub>14754</sub>, NRRL-Y-<sub>1789</sub>, VKM-Y-<sub>1397</sub>), así como una serie de cepas derivadas de la doble mutante auxotrófica NCYC 495 *ura3 leu2*. En el apéndice I se recogen todas las cepas derivadas de ésta que fueron empleadas en este trabajo.

En la mayoría de casos se trabajó con cepas prototróficas complementando las auxotrofías *leu2* y *ura3* con los plásmidos integrativos p18B1 y pBSURA3 que portan respectivamente los genes *LEU2* y *URA3* de *H. polymorpha*.

### 6.2. Esterilización del material

Los medios de cultivo y material de trabajo fueron esterilizados en una autoclave Raipa AE-75-DRY (Barcelona, España) durante 20 min a 121 °C y 1,1 bar de presión. Aquellos compuestos que por su termolabilidad no pudieron ser esterilizados en autoclave fueron esterilizados mediante filtración a través de filtros Millex de 0,22  $\mu$ m (Millipore, Billerica, MA, EEUU).

<sup>1</sup> En el apéndice IV se describen las características de los genotipos de las cepas de bacterias utilizadas.

### 6.3. Medios y condiciones de cultivo

Se emplearon medios de cultivo sólidos y líquidos tanto para levaduras como para bacterias. Los medios líquidos se prepararon disolviendo los componentes adecuados en agua destilada, tamponándolos en caso necesario y esterilizándolos en la autoclave. Para los medios sólidos se incorporó Bacto-Agar a una concentración final del 2 % (p/v). Los compuestos termolábiles fueron añadidos al medio estéril a partir de una disolución concentrada y estéril.

Los cultivos se iniciaron a partir de precultivos crecidos hasta saturación en el medio adecuado. Se emplearon volúmenes pequeños del precultivo para inocular matraces Erlenmeyer que contenían un volumen de medio como máximo igual a un quinto de su capacidad.

#### 6.3.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano

El medio de cultivo empleado de forma rutinaria para el crecimiento de bacterias fue el medio LB<sup>(1)</sup> (Luria Bertani). En la preparación de células competentes se utilizó el medio SOB<sup>(2)</sup>. La incubación de las células tras la transformación se llevó a cabo en medio SOC<sup>(3)</sup>, consistente en medio SOB suplementado con glucosa 20 mM.

Para la selección de clones de bacterias mediante genes de resistencia a antibióticos, éstos fueron incorporados a los medios de crecimiento a las siguientes concentraciones finales: 50 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina y 34 µg/ml de cloranfenicol.

Las bacterias se cultivaron a 37°C en placas de Petri o en medio líquido con agitación orbital de 180-220 rpm. El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la DO del cultivo a 595 nm. Para la selección y amplificación de algunos plásmidos las bacterias fueron incubadas a 30°C en lugar de 37°C. Esta modificación de la temperatura fue necesaria en la extracción rutinaria de ciertos plásmidos que portaban además de la ORF del gen de la levadura, la secuencia promotora y terminadora. Aunque desconocemos la causa exacta de este fenómeno pensamos que el gen se estaría expresando en bacterias y el producto, normalmente proteínas de membrana, podría ser tóxico para la célula debido a su hidrofobicidad.

( ) Los medios de cultivo y tampones aparecen numerados y descritos al final de Materiales y Métodos.

Es posible que al disminuir la temperatura a 30°C la transcripción de dichas ORF disminuya. La conservación de las cepas bacterianas durante largos períodos de tiempo se realizó mediante congelación a -80°C en glicerol al 15% (v/v).

### 6.3.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de levaduras

El crecimiento de levaduras en medio no selectivo se llevó a cabo en YPD<sup>(4)</sup>. El medio sintético empleado en el crecimiento selectivo contiene *Yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulfate* (YNB) (DIFCO-Becton, Sparks, MD, EEUU) al 0,17% (p/v) y glucosa al 2% (p/v), denominándose YG<sup>(5)</sup> a este medio. Cuando la fuente de nitrógeno añadida a este medio consistió en cloruro amónico pasó a denominarse YGNH, mientras que cuando fue nitrato sódico se denominó YGNO. La concentración de la fuente de nitrógeno empleada en los diferentes experimentos se indica siempre a continuación de las siglas del medio. En ocasiones el medio sintético empleado en el crecimiento selectivo se compuso de *Yeast nitrogen base without aminoacids* (YNB) DIFCO-Becton, Sparks, MD, EEUU) al 0,67% (p/v) y glucosa al 2% (p/v). Este medio que contiene sulfato amónico al 0,5 % (p/v) se denominó YGAS. Las auxotrofías para la leucina y el uracilo se suplieron añadiendo estos compuestos a unas concentraciones finales de 0,23 mM y 0,18 mM respectivamente a partir de disoluciones 50 veces concentradas y estériles.

Para la selección de células portadoras del gen *ble*, que confiere resistencia al antibiótico zeocina, el medio YPD fue suplementado con zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) a una concentración final de 100 µg/ml a partir de una disolución concentrada de 100 mg/ml.

*H. polymorpha* creció a 37°C. El crecimiento se realizó en placas Petri o en matraces Erlenmeyer agitados a 180-200 rpm. El crecimiento en medio líquido fue determinado midiendo la densidad óptica del cultivo a 660 nm, diluyendo las muestras del cultivo para obtener valores comprendidos entre 0,1-0,5 unidades de densidad óptica. El número de células y concentración del cultivo fueron determinados aplicando la siguiente relación:

$$1\text{U DO}_{660} \text{ (paso de luz 1 cm)} = 3,75 \text{ mg de células} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ (peso fresco)} \cong 7 \cdot 10^7 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (\text{A})$$

Para la conservación de las cepas de levadura durante largos períodos de tiempo las células se congelaron a -80°C en glicerol al 15% (v/v).

**Composición del *Yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulphate*<sup>1</sup>  
(concentraciones en el medio)**

ácido p-aminobenzoico	200 µg/L	biotina	2 µg/L
ácido bórico	500 µg/L	cloruro cálcico	0,1 g/L
pantotenato cálcico	400 µg/L	sulfato de cobre	40 µg/L
cloruro férrico	200 µg/L	ácido fólico	2 µg/L
inositol	2 mg/L	sulfato magnésico	0,5 g/L
sulfato de manganeso	400 µg/L	niacina	400 µg/L
ioduro de potasio	100 µg/L	Fosfato potásico	1 g/L
piridoxina HCl	400 µg/L	riboflavina	200 µg/L
cloruro sódico	0,1 g/L	molibdato sódico	200 µg/L
tiamina HCl	400 µg/L	sulfato de zinc	400 µg/L
pH final: 4,5			

<sup>1</sup>*Yeast nitrogen base w/o amino acids*, igual composición más sulfato amónico 5 g/L

**6.3.3. Medios de cultivo y condiciones para la inducción de los genes de asimilación de nitrato de *H. polymorpha***

Para inducir la expresión de los genes de asimilación de nitrato de *H. polymorpha* las células se crecieron *d.n.* en YGNH 5 mM hasta una DO de 2,7 unidades. Se recogieron mediante centrifugación a 4.863 x g (5.000 rpm) durante 7 min, se resuspendieron en 1 volumen de agua para eliminar restos del medio anterior, se volvieron a centrifugar y finalmente se resuspendieron en medio de inducción YGNO. La concentración de nitrato sódico de este medio varió entre 1 a 10 mM según el experimento. Las células se incubaron en este medio por un tiempo de 90 a 120 min en la mayoría de experimentos. En ocasiones, previo a la incubación en el medio de inducción las células se mantuvieron en ayuno de nitrógeno (YG) durante 1h para obtener unos niveles de inducción elevados y reproducibles.

#### 6.3.4. Siembra por goteo

La siembra por goteo, junto con el crecimiento en medio líquido, permitió caracterizar las cepas de levadura en cuanto al crecimiento en medios con distinta composición. En el goteo se depositó sobre medio sólido en forma de pequeñas gotas de 5  $\mu$ l una dilución seriada del cultivo, incubando la placa posteriormente de 24 a 48 h a 37 °C. Las diferencias en el crecimiento entre cepas se manifestaron en cuanto al número e intensidad de las diluciones crecidas.

Para preparar las diferentes diluciones de células se partió de un cultivo de 5 ml de YPD crecido hasta fase estacionaria. Se tomaron 200  $\mu$ l de cultivo en tubos tipo eppendorf estériles y se centrifugaron a 27000 x g durante 1 min y resuspendidas en 200  $\mu$ l de agua mili Q estéril. Se determinó la DO de la suspensión en el lector de microplaca MultiSKan EX (Labsystems) y a partir de ésta se estimó el número de células por ml según la expresión (A). Se prepararon cinco diluciones a partir de la suspensión que permitiesen tomar en un volumen de 5  $\mu$ l  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  células, siendo depositadas sobre placas de medio sólido. Se dejaron secar las gotas durante unos minutos en de la campana de flujo laminar y se incubaron las placas a 37 °C. El empleo de placas multipocillos y de una pipeta multicanal (Finnpipette BioControl-Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia) en la preparación de las diluciones y sembrado de las gotas simplificó en gran medida el procedimiento.

#### 6.4. Transformación de microorganismos

##### 6.4.1. Transformación de bacterias

La transformación de bacterias por choque térmico, así como la preparación de células competentes, se llevó a cabo según el protocolo descrito por Hanahan, 1986.

Para la obtención de células competentes de *E. coli* se partió de un preinóculo (5 ml) crecido hasta fase estacionaria en LB del que se tomó 0,9 ml para inocular 150 ml de SOB. Se dejó crecer el cultivo a 37°C hasta una  $DO_{595}$  de 0,4-0,6; entonces se enfrió sobre hielo durante 20 minutos y a continuación se centrifugó a 4.863 x g (5.000 rpm) durante 7 minutos a 4°C. Posteriormente las células se resuspendieron en 1/3 del volumen inicial (50 ml) de tampón RF1<sup>(6)</sup> frío y se incubaron en hielo durante 20 minutos más.

Tras este tiempo, las células se recogieron nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en 1/12,5 del volumen inicial (12 ml) de tampón RF2<sup>(7)</sup> frío y se incubaron 20 minutos en hielo. Finalmente se distribuyeron en alícuotas de 200 µl para su conservación a -80°C o para su uso inmediato.

Para llevar a cabo la transformación, se añadió el DNA plasmídico a las células previamente descongeladas dejando la mezcla 30 min sobre hielo. A continuación se sometieron las células a un choque térmico de 42 °C durante 90 s, enfriando seguidamente el tubo en hielo. Pasados 2 minutos, se añadieron 800 µl de SOC y la mezcla se incubó a 37°C con agitación continua durante 1 h. Los transformantes se seleccionaron en la mayoría de los casos por su capacidad para crecer en presencia de ampicilina (100 µg/ml). La eficiencia de transformación es de unos 5·10<sup>6</sup> transformantes/µg de DNA. Para la selección por color de las colonias transformadas ( $\alpha$ -complementación del gen *lacZ*), éstas fueron sembradas en placas de LB-agar sobre las que se extendieron 20 µl de X-gal 10% (p/v) en dimetilformamida y 20 µl de IPTG 100 mM, al menos 30 minutos antes de la siembra de *E. coli*. El color de las colonias se intensificó incubando las placas a 4°C.

#### **6.4.2. Transformación de *H. polymorpha***

La preparación de células competentes y la transformación de las mismas se llevó a cabo según Faber *et al.*, 1994.

Para preparar células competentes se inocularon 50 ml de YPD con un preinóculo fresco en un matraz de 250 ml, incubándolo a 37°C con agitación constante hasta que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento exponencial temprana ( $DO_{660} = 1,2-1,5$ ). Las células fueron recogidas por centrifugación a 4.863 x g (5.000 rpm) durante 5 minutos y resuspendidas en 0,2 volúmenes (10 ml) de tampón fosfato 50 mM pH 7,5 al que se le añadió DTT (25 mM concentración final) a partir de una disolución estéril de 1M en acetato sódico 0,01 M. Tras incubar las células a 37°C durante 15 min, se lavaron dos veces con tampón de electroporabilización STM<sup>(8)</sup> frío, la primera vez con 1 volumen (50 ml) y la segunda con 0,5 volúmenes (25 ml) para finalmente ser resuspendidas en 0,005 volúmenes (0,25 ml), lo que resultó en aproximadamente 2 x 10<sup>10</sup> células/ml. Tras distribuir las alícuotas de 60 µl fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso.

El DNA plasmídico para la transformación (~1µg) se añadió a los 60 µl de suspensión celular en un volumen no superior a 5 µl en agua destilada y esta mezcla se colocó en el fondo de una cubeta de electroporación fría con una distancia de separación entre electrodos de 2 mm. Para transformar las células se utilizó un electroporador BTX 600 (BTX inc., San Diego, CA, EEUU) aplicando los siguientes parámetros: campo eléctrico de  $7,5 \text{ Kv} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 50 µF de capacitancia y 129 Ω de resistencia, lo que resultó en un pulso eléctrico de aproximadamente 5 ms, tras el cual se añadió 1 ml de YPD a la mezcla de células + DNA. Después de 1 hora de incubación a 37 °C sin agitación, las células se recogieron por centrifugación durante 30 s a 16.060 x g (13.000 rpm) y se lavaron con 1 ml de medio mínimo (YG). Tras ser resuspendidas en 200 µl de YG se sembraron en las placas del medio selectivo y se incubaron a 37°C. Los transformantes, seleccionados por su capacidad para crecer en un medio sintético carente de leucina o uracilo o en presencia del antibiótico zeocina aparecen tras 1-2 días de incubación. Se observó variación en la eficiencia del método de transformación según la cepa.

## **6.5. Técnicas relacionadas con proteínas**

### **6.5.1. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares**

Para la determinación de actividades enzimáticas así como para el análisis de proteínas mediante SDS-PAGE se determinó la concentración de proteínas de los extractos crudos mediante el método de Bradford, 1976. Para ello se utilizó el reactivo de Bradford del *kit* comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) y albúmina bovina ó  $\gamma$ -globulina bovina como proteínas patrón. Los extractos fueron diluidos de 5 a 10 veces con agua y se utilizaron 5-10 µl del diluido para determinar la concentración de proteínas, añadiendo 200 µl del reactivo de Bradford y dejando desarrollar el color durante 5 min. Este proceso se hizo en placas multipocillos determinándose posteriormente la DO a 590 nm en un lector de placas (Multi-Detection Microplate Reader, Biotek).

## 6.5.2. Determinación de actividades nitrato reductasa y $\beta$ -galactosidasa

### 6.5.2.1. Obtención de extractos celulares para la determinación de actividad nitrato reductasa y $\beta$ -galactosidasa.

Los extractos libres de células se obtuvieron a partir de células recogidas en la fase exponencial del crecimiento ( $DO_{660}=2-2,6$ ) mediante rotura mecánica con bolas de vidrio ( $\varnothing$  0,5 mm) (González y Siverio, 1992). Aproximadamente 100 mg de células (peso fresco) fueron recogidas por centrifugación a  $1.750 \times g$  (3.000 rpm) durante 5 min a  $4^{\circ}C$  en tubos de vidrio de fondo redondo, lavadas con agua fría y congeladas a  $-20^{\circ}C$  hasta su uso. A las células congeladas (que se mantuvieron a  $4^{\circ}C$  durante todo el proceso de obtención de extractos) se les añadió 0,25 ml de tampón de extracción<sup>(9)</sup> frío con inhibidores de proteasas siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Complete Mini Tablets*, Roche, Indianapolis, IN, EEUU). Las células resuspendidas en el tampón fueron transferidas a tubos de 1,5 ml a los que también se añadieron bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Las células fueron homogeneizadas mediante agitación vigorosa en un homogeneizador *FastPrep* (Thermosavant LifeSciences, Hampshire, Reino Unido) durante 20 s a 6 m/s. Los tubos fueron enfriados sobre hielo; luego fueron perforados por el fondo con una aguja hipodérmica caliente y centrifugados sobre tubos nuevos a  $973 \times g$  (3.200 rpm) durante 1 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se clarificó centrifugándolo a  $10.580 \times g$  (13.000 rpm) durante 10 min a  $4^{\circ}C$ . Los extractos celulares así obtenidos fueron utilizados para la determinación de la actividad nitrato reductasa y  $\beta$ -galactosidasa.

### 6.5.2.2. Determinación de actividad nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa se determinó en un volumen de reacción de 500  $\mu$ l. La mezcla de reacción contenía 250  $\mu$ l de tampón de ensayo<sup>(10)</sup> y de 10-20  $\mu$ l de extracto, completándose hasta 450  $\mu$ l con agua. Esta mezcla se incubó a  $30^{\circ}C$ , iniciando la reacción mediante la adición de 50  $\mu$ l de NADH 2 mM. Después de 15 minutos la reacción fue detenida por adición de 500  $\mu$ l de N-(1-naftil)-etilendiamina 0,02% (p/v) (reactivo A) y 500  $\mu$ l de sulfanilamida 1% (p/v) en HCl 1% (v/v) (reactivo B). Estas dos disoluciones permiten la detección colorimétrica del nitrito mediante una reacción de diazotización, formándose un compuesto azo que absorbe a una longitud de onda de 540



nm. El límite de detección de este método es de 2,5  $\mu\text{M}$  de nitrito en agua. La actividad específica nitrato reductasa se expresó como nmoles de nitrito  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}$ .

### 6.5.2.3. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa

La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue valorada a partir de 15 a 60  $\mu\text{l}$  de extracto, usando 450  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo  $\beta$ -galactosidasa (tampón Z)<sup>(11)</sup> y completando con agua hasta 500  $\mu\text{l}$ .

La mezcla de reacción se incubó a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, tras los cuales se inició la reacción por adición de 100  $\mu\text{l}$  de ONPG preparado en el momento a 4 mg/ml en tampón Z y se dejó desarrollar la reacción hasta que la disolución tomase color amarillo pálido, momento en que se fue detenida añadiendo 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Posteriormente se determinó la absorbancia a 420 nm. Un valor de 0,0045 unidades de  $A_{420 \text{ nm}}$  corresponde a 1 nmol/ml de *o*-nitrofenol producido. La actividad específica se expresa en nmoles de *o*-nitrofenol  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}$ .

### 6.5.2.4 Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa *in situ* a partir de células permeabilizadas con cloroformo sobre filtros.

Las colonias fueron ordenadas a modo de estrías con ayuda de un palillo estéril en medio YGNH. Tras 48 horas de crecimiento a 37 $^{\circ}\text{C}$  las células se replicaron a YGNO 0.5 mM ó NaCl 0,5 M donde se incubaron durante 48 horas. Transcurrido este tiempo filtros de papel Whatmman 3 MM se depositaron orientados sobre las placas para permitir la transferencia de las células. La permeabilización de las células se logró sumergiendo los filtros en cloroformo de forma que las células quedaran hacia abajo, durante 5 minutos, para lo cual se utilizó un recipiente de vidrio rectangular de 3 cm de profundidad, que se rellenó a un medio de su capacidad total. Transcurrido este tiempo y una vez eliminado el cloroformo, los filtros se pusieron en contacto con la mezcla de reacción (Tampón Z + X-gal a 1 mg/ml) empleando para ello la base de una placa de Petri. Se emplearon 1,5 ml de mezcla de reacción por filtro. El desarrollo de la actividad, detectable por la coloración azul que adquieren las células, tuvo lugar después de 15-20 minutos y adquirió su máximo a las pocas horas de incubación.

### 6.5.3 Determinación de la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (Pma1)

Las fracciones de membranas totales se obtuvieron a partir 200 mg de células (peso fresco) que tras ser recogidas por centrifugación y congeladas fueron resuspendidas en 300 µl de tampón de lisis<sup>(12)</sup>. Se añadieron bolas de vidrio de Ø 0,5 mm. La rotura mecánica de las células se llevó a cabo mediante tres ciclos de agitación en vórtex de 1 minuto seguidos de 1 minuto en hielo, la adición de 200 µl más de tampón y un último ciclo de vórtex. El sobrenadante se clarificó mediante 3 centrifugaciones consecutivas de 1 minuto a 973 x g (3200 rpm). La centrifugación del sobrenadante a 14.087 x g (15000 rpm) a 4°C durante 30 minutos permitió la recolección principalmente de membrana plasmática que se resuspendió en 1 ml de tampón de resuspensión<sup>(13)</sup> con ayuda de un homogeneizador de tejidos Potter-Elvehjem.

En la determinación de la actividad de Pma1 se aplicó el protocolo descrito por R. Serrano (Serrano, 1983), basado en la medida del fosfato inorgánico generado por la hidrólisis de ATP. Para medir específicamente la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática, el tampón de ensayo contiene nitrato, azida y molibdato que inhiben a las ATPasas vacuolares, mitocondriales y fosfatasa ácida respectivamente. En una placa multipocillos se colocaron dos series de duplicados de 5 y 10 µl de cada fracción, llevando a 10 µl con agua. A una serie se le añadió 70 µl de tampón PM-ATPasa<sup>(14)</sup> sin ATP, y estos pocillos se utilizaron como controles del fosfato endógeno y turbidez. A la otra serie se le añadió 70 µl de tampón PM-ATPasa suplementado justo antes de usar con ATP (1 volumen de ATP 0,1 M por cada 50 volúmenes de tampón). La placa incorpora además dos controles del fosfato contaminante en el ATP, en donde a 10 µl de agua se les añade 70 µl de tampón PM-ATPasa suplementado con ATP, y una curva patrón elaborada con fosfato inorgánico. La reacción se dispara con la adición del tampón PM-ATPasa + ATP y se incuba a 30°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo se detiene con 130 µl de reactivo Pi<sup>(15)</sup> al que se le ha añadido justo antes de usar 1 volumen de ácido ascórbico al 10% (p/v) por cada 100 volúmenes de reactivo Pi. Se dejó desarrollar el color durante 5 min y se midió la absorbancia a 650 nm. La actividad H<sup>+</sup>-ATPasa se expresó como nmol Pi·min<sup>-1</sup>·(mg de proteína)<sup>-1</sup>. En la preparación de los reactivos se utilizó agua mili-Q.

#### **6.5.4 Obtención de extractos de proteínas solubles para SDS-PAGE.**

La obtención de extractos de proteínas totales se realizó siguiendo básicamente el protocolo indicado en el punto 6.5.2.1 exceptuando el tampón de extracción<sup>(16)</sup> que fue diferente. Al sobrenadante se le añadió un volumen de tampón de desnaturalización<sup>(17)</sup> 4X y se incubó a 95°C durante 5 min.

#### **6.5.5. Obtención de extractos de proteínas de membrana para análisis mediante SDS-PAGE**

Los extractos se realizaron a partir de 50 mg de células (peso fresco) que tras ser recogidas por centrifugación y congeladas fueron resuspendidas en 300 µl de tampón de extracción<sup>16</sup>. La suspensión se transfirió posteriormente a un tubo de 1,5 ml y se añadieron bolas de vidrio de diámetro 0,5 mm hasta aproximadamente 1 mm de la superficie. Las células fueron rotas por cizallamiento en un homogeneizador *FastPrep* (Thermosavant LifeSciences, Hampshire, Reino Unido), a una velocidad de 6 m/s durante 20 s. El homogeneizado se transfirió a un nuevo tubo perforando el fondo del tubo que contenía el homogeneizado + bolas de vidrio y centrifugándolo a 973 x g (3.200 rpm) durante 1 min a temperatura ambiente; posteriormente, el sobrenadante fue clarificado mediante tres centrifugaciones consecutivas adicionales a 973 x g (3.200 rpm) durante 1 min a temperatura ambiente, tras cada una de las cuales el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El sobrenadante clarificado se centrifugó finalmente a 14.087 x g (15.000 rpm) durante 30 min a 4 °C para obtener una fracción enriquecida en membrana plasmática. Tras esta centrifugación se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 70 µl de Tritón X-100 al 0,025 % (p/v) con ayuda de una micropipeta. Para determinar la concentración de proteínas se reservaron 10 µl del extracto y al resto se le añadió 20 µl de tampón de desnaturalización 4X<sup>(17)</sup>. Por último, los tubos fueron calentados a 40°C durante 30 min y conservados a -20 °C hasta la electroforesis.

#### **6.5.6. Tratamiento de los extractos proteicos con λ-proteína fosfatasa**

Para la desfosforilación de proteínas se trataron 20 µg de proteínas con 150 U de λ-proteína fosfatasa (New England Biolabs, Beverly, EEUU) durante 25 min a 30°C, en

presencia del tampón de la  $\lambda$ -proteína fosfatasa<sup>(18)</sup> y  $\text{MnCl}_2$  2 mM. Los extractos fueron obtenidos como se describe en el apartado anterior excepto que el tampón de extracción y disolución de resuspensión carecían de EDTA, EGTA, NaF,  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$  y  $\text{NaN}_3$ . Después del tratamiento con  $\lambda$ -proteína fosfatasa se añadió tampón de desnaturalización (4X) y se calentaron los extractos a 95°C durante 5 min.

#### **6.5.4 Obtención de extractos totales para SDS-PAGE mediante método alcalino**

La obtención de extractos de proteínas totales se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito por Y. Matsuo (2006) con algunas modificaciones. Este método se utilizó para la selección de los clones etiquetados con el epítipo HA dado el gran número de clones a analizar y la mayor facilidad en el procesamiento de las muestras. Las colonias fueron ordenadas a modo de estrías con ayuda de un palillo estéril en medio YGNH ó YGNO 5 mM. Tras 48 horas de crecimiento a 37°C las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  en tubos eppendorf. Entonces se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,2 M y los tubos se sometieron a agitación vigorosa sobre un vórtex durante varios segundos. Las células se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente tras lo cual se centrifugaron a 10580 x g (13000 rpm) durante 2 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  de tampón de desnaturalización<sup>(17)</sup> y se incubó a 95°C durante 5 min. Con el fin de eliminar los restos celulares los tubos se centrifugaron durante 1 min y se tomaron 20-25  $\mu\text{l}$  de extractos para su análisis mediante SDS-PAGE.

#### **6.5.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

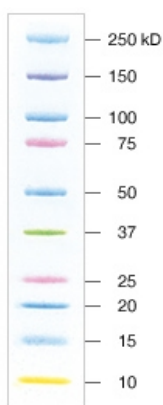
Para la separación de proteínas por electroforesis se utilizaron minigeles discontinuos de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) llevando a cabo la electroforesis en una cubeta vertical Mini-Protean®3 (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante para el método de Laemmli.

Los geles discontinuos fueron elaborados a partir de una disolución de acrilamida/bisacrilamida<sup>(19)</sup> [30% (p/v) monómero total; 2,67% (p/v) entrecruzamiento]. El gel superior de compactación<sup>(20)</sup> de unos 2 cm de largo elaborado al 4% (p/v) de

monómero total, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; y un gel inferior de resolución<sup>(21)</sup> con un porcentaje de acrilamida de 8 a 12 % (p/v) según la aplicación, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8. La concentración de SDS en ambos geles fue 0,1% (p/v).

La electroforesis se desarrolló aplicando tres diferencias de potencial diferentes a lo largo del tiempo: 50 V hasta que la muestra entró completamente en el gel, 150 V para producir una buena compactación de la misma en el gel de compactación y 100 V una vez dentro del gel de resolución hasta el final de la electroforesis.

La evolución de la electroforesis así como la estimación de la masa molecular de las bandas fue realizada a partir de marcadores de peso molecular preteñidos con colorantes específicos (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).



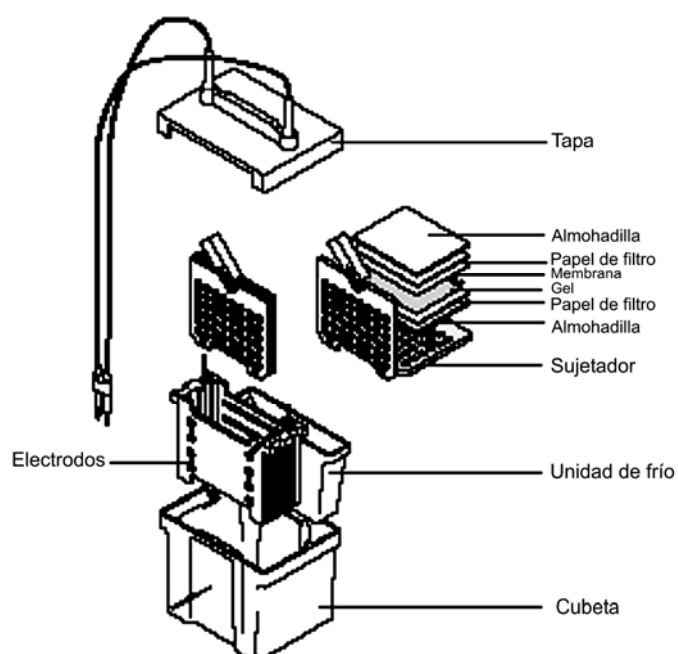
**Figura 1. Marcadores preteñidos *Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™*.**

La visualización de las proteínas separadas por electroforesis se realizó por inmersión del gel en una disolución de tinte<sup>(23)</sup> Coomassie durante 10 min con agitación suave. Posteriormente se eliminó el exceso de colorante por inmersión del gel en las disoluciones de destinte I<sup>(24)</sup> y II<sup>(25)</sup> (15 min en cada una de ellas).

#### 6.5.8. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EEUU) mediante el dispositivo de electrotransferencia Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Este paso fue necesario para posteriormente inmunodetectar proteínas específicas (*western blot*). Las membranas se humedecieron previamente en metanol durante unos 15 s y a continuación fueron sumergidas en tampón de transferencia<sup>(26)</sup> de 10 a 15 min. Se

dispusieron en contacto con los geles de poliacrilamida como se observa en la figura 2 y en la orientación adecuada respecto a los electrodos de la cubeta. La transferencia se llevó a cabo en tampón de transferencia aplicando una diferencia de potencial constante de 100 V durante 90 minutos a temperatura ambiente o 30 V durante toda la noche a 4°C. Las membranas con las proteínas transferidas fueron procesadas seguidamente enjuagándolas con PBS-T<sup>(27)</sup> o se dejaron secar y fueron conservadas a 4°C hasta su utilización. En este último caso las membranas fueron activadas sumergiéndolas brevemente en metanol y enjuagándolas posteriormente con PBS-T.



**Figura 2. Disposición del gel y membrana en la transferencia de proteínas**

#### **6.5.9. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas (*western blot*)**

En la inmunodetección de proteínas transferidas a membranas el primer paso consistió en el bloqueo de las membranas con disolución de bloqueo (leche en polvo desnatada La Asturiana 5% (p/v), disuelta en PBS-T) durante 30-60 min con agitación a temperatura ambiente. Seguidamente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución indicada en la tabla 1. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en leche desnatada al 0,5% (p/v) en PBS-T durante 45-60 min. A

continuación se lavaron las membranas con PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo, realizando tres lavados con agitación de 5-10 min cada uno. Al finalizar el último lavado se incubaron las membranas durante 20-60 minutos con anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a peroxidasa de rábano a la concentración que se indica en la Tabla 1 en leche desnatada al 0,5% (p/v) en PBS-T. Seguidamente se retiró el exceso de anticuerpo secundario lavando las membranas de la misma forma que para el anticuerpo primario y se llevó a cabo la detección de las bandas específicas mediante el sistema de quimioluminiscencia Inmobilon Western (Millipore Corporation, Billerica, U.S.A) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal quimioluminiscente se detectó directamente usando la cámara CCD del sistema de análisis de imagen del Molecular Imager Chemidoc™ XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) o por impresión de una película radiográfica que posteriormente fue documentada utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). La cuantificación de señales de *western blot* se realizó sobre densitometrías de películas radiográficas o directamente sobre la imagen tomada por la cámara CCD del sistema Chemidoc mediante el programa QuantityOne, utilizando la opción de cuantificación por volúmenes.

Tabla 1. **Anticuerpos utilizados en este trabajo y concentraciones de uso**

	<b>Antígeno</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Dilución empleada</b>	<b>Origen</b>
<b>Anticuerpos primarios</b>	Ynt1	Inmunosuero de conejo	1:1.500	GMN
	ScPma1	Inmunosuero de conejo	1:5.000	Dr R. Serrano*
	6HA	Inmunosuero de ratón	1:1000	Roche
<b>Anticuerpos secundarios</b>	IgG de ratón	Inmunosuero de oveja	1:10.000	Sigma
	IgG de conejo	Inmunosuero de cabra	1:50.000	Amersham

GMN: Grupo del Metabolismo del Nitrógeno de la Universidad de La Laguna

\* Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC.

## 6.6 Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos

Muchas de las técnicas descritas a continuación están recogidas en Sambrook, 2001.

### 6.6.1 Extracción de DNA plasmídico bacteriano a pequeña escala ("mini-preps")

Este método se utilizó fundamentalmente para la verificación de las construcciones de DNA ya que permite obtener de forma rápida DNA plasmídico a partir de un volumen pequeño de cultivo. El método parte de un cultivo de bacterias crecido a 37°C durante la noche de 2 ml de LB con el antibiótico adecuado para el cual el plásmido confiere resistencia. El cultivo se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó durante 60 s a 16.060 x g (13.000 rpm); se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células en 100 µl de tampón STET<sup>(28)</sup> y el tubo se colocó en un baño con agua hirviendo durante 1 min. A continuación el tubo se enfrió en hielo durante 5 minutos para posteriormente centrifugarlo a 16.060 x g (13.000 rpm) durante 10 min. El sedimento mucoide que contiene restos celulares y DNA cromosómico fue eliminado con ayuda de un palillo estéril. El DNA plasmídico presente en el sobrenadante se dejó precipitar durante 5 min añadiendo 200 µl de isopropanol. Este precipitado se recogió mediante centrifugación a 16.060 x g (13.000 rpm) 5 min y fue lavado con 1 ml de etanol al 70% (v/v). Tras retirar los restos de etanol mediante secado a 37°C se resuspendió el sedimento en 20 µl de agua.

Para extraer DNA plasmídico con la pureza suficiente para llevar a cabo manipulaciones más complejas como ligamientos, secuenciación, etc., se empleó el *kit* comercial de extracción de plásmidos QIAprep® Spin Miniprep *Kit* (QIAgen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este *kit* está basado en el método de lisis alcalina. Las bacterias son lisadas bajo condiciones alcalinas y seguidamente el lisado es neutralizado y ajustado a condiciones de alta concentración de sales. Bajo estas condiciones el DNA queda adsorbido a una membrana de silica-gel. Finalmente se eluye el DNA con baja concentración de sal.



### **6.6.2. Extracción de DNA total de levadura**

Este protocolo permite obtener DNA genómico de levadura en cantidad y calidad suficiente como para poder utilizarlo como molde de PCR y para realizar hibridación de sondas.

Se parte de un cultivo de 5 ml de células crecido a 37°C hasta fase estacionaria en medio líquido YPD. Las células se recogen por centrifugación a 4.863 x g (5.000 rpm) durante 5 min y a continuación se lavan con 1 ml de agua destilada. Se recogen nuevamente las células por centrifugación y se resuspenden en 0,5 ml de tampón de lisis<sup>(29)</sup>, pasando la suspensión celular a un tubo de 1,5 ml. A éste se añaden bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro hasta alcanzar un volumen de 1,25 ml. El tubo conteniendo bolas de vidrio y células se somete a agitación vigorosa sobre un vórtex durante 2 min. El tubo se perfora por el fondo mediante una aguja hipodérmica caliente y se centrifuga sobre un tubo limpio recogiendo el sobrenadante, al que se le añade 275 µl de acetato de amonio 7 M a pH 7. La muestra se calienta a 65°C durante 5 min y a continuación se enfría sobre hielo durante otros 5 min. Transcurrido este tiempo se le añade 500 µl de cloroformo, se agita y se centrifuga durante 2 min a 16.060 x g (13.000 rpm). El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y el DNA se precipita con 1 ml de isopropanol durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se recoge el precipitado mediante centrifugación a 16.060 x g (13.000 rpm) durante 5 min. El sedimento se lava con 1 ml de etanol al 70% (v/v) y los restos del mismo se eliminan secando los precipitados a 37°C. Finalmente, el DNA genómico se resuspende en 60 µl agua bidestilada.

El DNA genómico que se obtiene se encuentra contaminado por RNA. Por ello, en determinadas ocasiones se procedió a la eliminación del RNA mediante tratamiento con RNAasa. Concretamente, se añadió 1 µl RNAasa 10 mg/ml a 60 µl de DNA genómico y se incubó la muestra a 37°C durante 30 min. El DNA genómico fue precipitado con 100 µl de etanol + acetato de amonio 7 M (6 vol +1 vol) y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v).

### 6.6.3 Extracción de RNA de levadura

Para la obtención de RNA se utilizó el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania) que está basado en la utilización de una resina de intercambio iónico inmovilizada en una columna que en condiciones de alta concentración salina retiene selectivamente el RNA. Inicialmente se observó que el seguimiento de las recomendaciones del fabricante nos conducía resultados poco satisfactorios. Por tanto, el protocolo que se describe a continuación es el resultado de una optimización para *H. polymorpha*.

Se recogieron 100 mg de células en tubos de vidrio. Se añadieron 300  $\mu$ l de tampón RLT incluido en el kit y bolas de vidrio hasta casi cubrir la superficie del líquido. Los tubos se agitaron vigorosamente en vórtex durante 3 min intercalando 1 min en hielo por cada min de agitación. A continuación se añadieron 200  $\mu$ l más del mismo tampón agitándose 1 min en vórtex, tras lo cual se centrifugaron los tubos a  $4.863 \times g$  (5.000 rpm) durante 8 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante sin apurar con una micropipeta y se transfirió a un tubo de 1.5 ml, el sobrenadante se clarificó centrifugando 1 min a  $16.060 \times g$  (13.000 rpm) y pasando a un tubo nuevo. A partir de este momento se siguieron las instrucciones del fabricante. El sobrenadante se transfirió a la columna de intercambio iónico y después de varios pasos de lavado en distintos tampones se eluyó la columna con 40  $\mu$ l de agua libre de RNasa. El RNA obtenido se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm y aplicando la fórmula: Concentración ( $\mu$ g/ml)=Absorbancia (260 nm)  $\cdot$  40  $\cdot$  factor de dilución en la medida. Siguiendo este protocolo se obtuvieron cantidades de RNA que oscilaban entre los 50 y los 100  $\mu$ g. También se determinó su pureza, mediante la relación  $A_{260/280}$  que siempre se mantuvo entre los valores óptimos 1.9 a 2.1.

Al comprobar por PCR que el RNA obtenido estaba contaminado por DNA genómico de la levadura, tratamos las muestras con DNasa I. El fabricante del kit recomienda el uso de esta enzima directamente en la columna durante el proceso de extracción, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios y el RNA seguía contaminado por DNA. Se decidió entonces optimizar también el proceso de descontaminación. 5  $\mu$ l de muestra se trataron con 1.35 U Kunitz de DNasa en tampón de DNasa<sup>(33)</sup> (el volumen total de la mezcla se debe llevar a 9  $\mu$ l con agua libre de RNasa) durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió 1  $\mu$ l de EDTA 0.1 M para quelar el  $Mg^{2+}$  e inactivar la DNasa. Deberá prestarse especial atención al

usar este RNA descontaminado en reacciones sensibles al EDTA (PCR, retrotranscripciones, etc) debido a la presencia del quelante en la preparación.

Las muestras de RNA pueden conservarse a -20°C unos días o a -80°C durante periodos más largos. No obstante, debido a la fragilidad del RNA lo recomendable es utilizarlo recién extraído.

#### 6.6.4 Síntesis de cDNA mediante retrotranscripción

El cDNA se obtuvo por retrotranscripción del RNA, usando el kit comercial *iScript cDNA Sintesis Kit* (Bio-Rad, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como molde de la reacción se usó 1 µg de RNA obtenido tal y como se detalla en el apartado anterior.

##### Retrotranscripción

- |                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| • RNA <sup>1</sup>          | 2 µl (1µg)    |
| • Tampón RT 5X <sup>2</sup> | 4 µl (1X)     |
| • Transcriptasa reversa     | 0.5 µl (50 U) |
| • Agua libre de RNasa       | 13.5 µl       |

Esta mezcla se incubó en un termociclador durante 5 min a 25°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C.

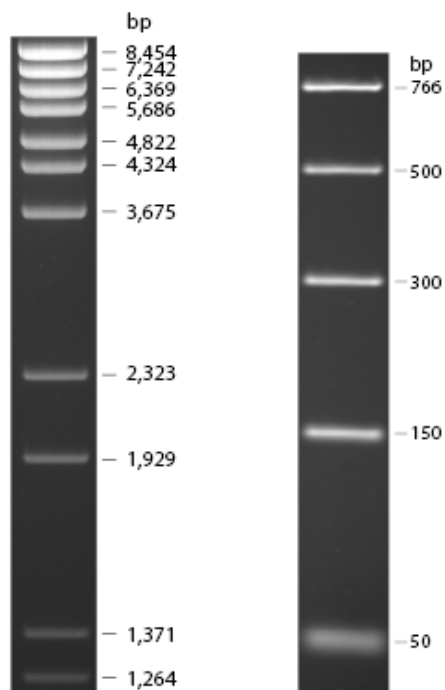
<sup>1</sup> No se deben emplear más de 2 µl de RNA en la reacción pues como se comentó en el apartado anterior la muestra contiene EDTA y puede interferir en la reacción de retrotranscripción.

<sup>2</sup> El tampón RT contiene, el Mg<sup>2+</sup>, los nucleótidos, una mezcla de oligonucleótidos dT y *random* y un inhibidor de RNasas.

#### 6.6.5. Cuantificación del DNA

Una estimación semicuantitativa de la concentración de DNA presente en las muestras extraídas se obtuvo mediante tinción de los geles de electroforesis con bromuro de etidio y exposición sobre luz UV (302 nm). La fluorescencia emitida por las muestras problema se comparó con la emitida por una escalera de marcadores de peso molecular y cantidad de DNA conocidas. El patrón de peso molecular utilizado rutinariamente fue el fago λ digerido con la enzima de restricción *BstEII*, la cual genera

un conjunto de fragmentos de 0,2 a 8,5 Kpb. Para analizar fragmentos de DNA de pequeño tamaño el patrón usado fue el marcador de peso molecular *PCR Marker* (de 700 a 50 pb) (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EEUU).



**Figura 3.** Fago lambda digerido con *BstEII* (izquierda) y marcador de peso molecular para productos de PCR (derecha) teñidos con bromuro de etidio en geles de agarosa al 1% y al 1,8 %, respectivamente.

### 6.6.6 Precipitación de DNA

La precipitación de DNA se realizó de forma rutinaria con acetato de sodio a una concentración final de 0,3 M y dos volúmenes de etanol frío a 96% (v/v). El DNA se precipitó a -20°C durante 30 min y a continuación se centrifugó a 14.087 x g (15.000 rpm) 4°C durante 15 min. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol frío a 70% (p/v), centrifugando a 14.087 x g (15.000 rpm) 4°C durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para eliminar los restos de etanol.

### 6.6.7. Amplificación de moléculas de DNA por PCR

#### 6.6.7.1. PCR a partir de DNA purificado

La técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha sido utilizada en este trabajo con distintos fines: obtención de fragmentos de DNA para la construcción de plásmidos, identificación de clones de bacterias y levaduras que portan fragmento de DNA de interés, determinación de la orientación del inserto en un plásmido, obtención de fragmentos de DNA para transformar levaduras y confirmación de la interrupción de una secuencia génica en levaduras.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 20-100  $\mu$ l en tubos de 0,2 ml y utilizando los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas:

<b>DNA molde</b>	$\approx$ 5 ng de DNA plasmídico $\approx$ 100 ng de DNA genómico
<b>Cebador Forward</b>	0,5 $\mu$ M
<b>Cebador Reverse</b>	0,5 $\mu$ M
<b>Tampón Taq polimerasa</b>	1 X
<b>dNTPs</b>	0,2 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2,5 mM
<b>Taq polimerasa</b>	0,8-1,2 U

Las moléculas de DNA utilizadas como molde se encontraban disueltas en agua o en tampón libre de EDTA.

En el diseño de los cebadores se tomaron como precauciones generales la ausencia de apareamientos intramoleculares y secuencias complementarias en los extremos 3' de cada pareja de cebadores y que los cebadores de cada pareja poseyeran una  $T_m$  similar. Para el diseño de muchos de los cebadores empleados en este trabajo se recurrió al programa de la base de datos de *Saccharomyces* (*Saccharomyces Genome Database*: [http:// genome-www.stanford.edu / Saccharomyces /](http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/)). Los cebadores utilizados en este trabajo se recogen en el apéndice II.

La mezcla de dNTPs se preparó a una concentración final de 5 mM para cada uno de los cuatro desoxinucleótidos. De forma rutinaria se usó *Taq* DNA polimerasa de la casa comercial GenScript Corporation (Piscataway, USA). El tampón *Taq* polimerasa empleado fue: (10X) Tris-HCl 100 mM (pH 9,0); KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; Tritón X-100 1 %.

Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de amplificación se recogen en la tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones para la amplificación de DNA por PCR**

Temperatura	Tiempo	
94°C	2-5 min	
94°C	30-45 s	30 ciclos
T <sub>a</sub> <sup>1</sup>	30 s	
72°C	tiempo de extensión <sup>2</sup>	
72°C	5-7 min	

<sup>1</sup> T<sub>a</sub>, temperatura de anillamiento, generalmente 5°C por debajo de la T<sub>m</sub> de los cebadores

<sup>2</sup> se estableció 1 min por Kpb de DNA a amplificar como tiempo de extensión

Cuando se requirió mayor fidelidad de copia que la originada por la *Taq* polimerasa, se empleó *Pfu* DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, EEUU). Esta enzima posee actividad correctora (3'-5' exonucleasa) lo que disminuye 6 veces la tasa de error en la copia de DNA respecto a la *Taq* polimerasa.

El tampón empleado para la reacción de la *Pfu* fue el siguiente: (1X) Tris-HCl 20 mM (pH 8), KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Tritón X-100 0,1% (p/v) y BSA 0,1 mg/ml. Las condiciones de reacción ensayadas fueron las mismas que las utilizadas para la *Taq* polimerasa pero con la diferencia de que el tiempo de extensión fue aumentado a 2 min por Kpb a amplificar.

### **6.6.7.2. PCR de colonias de bacterias y levaduras**

Esta técnica permite la amplificación de secuencias por PCR a partir de colonias de bacterias o levaduras sin necesidad de aislar previamente el DNA. Su uso en este trabajo tuvo como fin la identificación de clones de bacteria o levadura portadores de las secuencias de interés.

La PCR de colonias de bacterias se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado en el apartado anterior, con la única diferencia de que el DNA molde es sustituido por la colonia de bacteria a analizar. La colonia es recogida con ayuda de una punta estéril de micropipeta y resuspendida en 8 µl de agua desionizada estéril. A la mezcla de reacción de la PCR se le añadió 4 µl de la suspensión de células. A partir de colonias de bacterias se pudo amplificar fragmentos de DNA de hasta 2 Kpb.

Para llevar a cabo la PCR a partir de colonias de levaduras se transfirió una pequeña porción de la colonia a un tubo de PCR resuspendiendo las células en 15 µl de agua. Dicha suspensión se incubó a 95°C durante 5 minutos en un termociclador. Tras la incubación se añadió la mezcla de PCR y la *Taq* polimerasa para iniciar la reacción en el termociclador.

### **6.6.8. Análisis y modificación de DNA**

#### **6.6.8.1. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción**

Los tratamientos con endonucleasas de restricción se realizaron para caracterizar, identificar y construir moléculas de DNA. El DNA se digirió a la temperatura requerida por la endonucleasa de restricción en un volumen de reacción de 20 a 100 µl y una concentración de DNA de aproximadamente 20-50 ng/µl, empleando de 5-10 U de la endonucleasa de restricción por µg de DNA y el tampón recomendado por la casa comercial que distribuye la enzima (Roche, Promega, New England Biolabs). En ocasiones la digestión se llevó a cabo utilizando el tampón universal OPA<sup>+(30)</sup> (*One-Phor-All* Buffer PLUS, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) diluido convenientemente según la/s enzima/s empleada/s.

### **6.6.8.2. Electroforesis de DNA**

La separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida.

#### **6.6.8.2.1 Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de ácidos nucleicos con un tamaño comprendido entre 0,3 y 30 Kpb se realizó en geles de agarosa sumergidos. Los geles se prepararon en tampón TAE<sup>(31)</sup> 1X a la concentración adecuada de agarosa (0,5-2%) según el tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La agarosa fue fundida calentándola en un microondas y se dejó enfriar a temperatura ambiente para permitir su gelificación. En cada pocillo del gel se aplicaron 5-20 µl de muestra mezclada con tampón de carga<sup>(32)</sup>. Las electroforesis se realizaron a diferencia de voltaje constante (75-140V).

La evolución de la electroforesis se siguió mediante los colorantes del tampón de carga, el azul de bromofenol y el verde de xilén cianol. Tras la electroforesis los geles fueron sumergidos en una disolución acuosa de bromuro de etidio preparada a 0,5 mg/ml. Para la visualización de las bandas de DNA los geles teñidos con bromuro de etidio se expusieron a luz ultravioleta de 302 nm y se fotografiaron empleando el equipo Molecular Imager ChemiDoc XRS (Biorad, EEUU). El tamaño y cantidad de los fragmentos de DNA fueron estimados en función de los patrones moleculares de tamaño y cantidad conocidos.

#### **6.6.8.3. Construcción de moléculas de DNA recombinantes**

En la construcción de los vectores descritos en este trabajo se aplicó el siguiente procedimiento:

1. Vector e inserto fueron digeridos y extraídos de gel de agarosa en la mayoría de las construcciones excepto en aquéllas en las que el vector empleado fue el pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, EEUU). En este último caso se siguieron las indicaciones del fabricante. El aislamiento desde gel permitió eliminar el resto de plásmido no digerido.

2. Se realizó un control para comprobar la ausencia de plásmido sin digerir en el aislado de gel transformando *E. coli* con 50-100 ng de éste.



3. En todos los casos, aún no siendo necesaria la desfosforilación del vector por tener extremos incompatibles, se comprobó mediante una reacción de ligamiento con el vector exclusivamente que no se obtenían transformantes. En el caso de ser necesaria la desfosforilación del vector se hicieron tres ensayos de desfosforilación con distintas cantidades de fosfatasa y su eficiencia fue comprobada igualmente mediante reacciones de ligamiento independientes y transformación de *E. coli*. Para la construcción del plásmido se tomó el vector del tratamiento con menor cantidad de fosfatasa que hubiese originado menos de 5 transformantes.

4. Una vez comprobada la calidad del vector y del inserto, se procedió a montar la reacción de ligamiento entre ambos y posteriormente se transformaron las bacterias.

5. Obtenidos los transformantes, en la mayoría de los casos no fue necesario analizar más de 6 transformantes para encontrar el plásmido recombinante deseado. El análisis de los transformantes se hizo con frecuencia mediante PCR de colonia y se procedió a extraer plásmido de los clones positivos.

6. El plásmido extraído fue digerido con al menos dos enzimas de restricción y en ocasiones parcialmente secuenciado para confirmar que se trataba del plásmido deseado.

#### **6.6.8.3.1. Aislamiento de fragmentos de DNA de geles de agarosa**

El aislamiento de fragmentos de DNA de geles de agarosa se llevó a cabo escindiendo el pedazo del gel que contuviese el DNA de interés con ayuda de un bisturí estéril. La muestra fue procesada empleando el *kit* comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **6.6.8.3.2. Relleno de extremos 3' no protuberantes**

Cuando se hizo necesario rellenar extremos 3' no protuberantes se utilizó la actividad polimerasa del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Promega, Madison, WI, EEUU) en presencia de la concentración de dNTPs apropiada.

El DNA digerido fue precipitado y resuspendido en 10  $\mu$ l de agua. La reacción de relleno se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l.

**Reacción de relleno con Klenow:**

DNA	1-4 $\mu$ g
Tampón de reacción <i>Klenow</i>	1X
dNTPs	40 $\mu$ M
Fragmento <i>Klenow</i> de DNA pol I	1 U/ $\mu$ g de DNA

La composición del tampón de reacción del fragmento *Klenow* es: (10X) Tris-HCl 500 mM pH 7,2; MgSO<sub>4</sub> 100 mM; DTT 1 mM.

La mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 37°C. El fragmento *Klenow* fue inactivado calentando la reacción a 75°C durante 10 min.

**6.6.8.3.3. Desfosforilación de los extremos 5' de moléculas de DNA**

Este procedimiento permite eliminar grupos fosfato de los extremos 5' de vectores linealizados impidiendo su recircularización en ligamientos posteriores. Tras la digestión del plásmido y en algunos casos el relleno de los extremos, el plásmido linealizado a desfosforilar es extraído de gel siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.6.8.3.1. La desfosforilación se llevó a cabo a 37°C empleando fosfatasa alcalina de camarón (*Pandalus borealis*) (Roche, Indianapolis, IN, EEUU) la cual se inactiva a 65°C. La reacción de desfosforilación se realizó en un volumen de 10-20  $\mu$ l aplicando las siguientes proporciones para los tratamientos de desfosforilación estándares:

a) 1 unidad de fosfatasa alcalina para un máximo de 1 pmol de extremos 5' fosforilados (protuberantes o recesivos) .Tratamiento: 37°C, 10 min.

b) 1 unidad de fosfatasa alcalina para un máximo de 0,2 pmoles de extremos 5' fosforilados romos. Tratamiento: 37°C, 60 min.

La composición del tampón de desfosforilación es: (10X) Tris-HCl 0,5 M pH 8,5; MgCl<sub>2</sub> 50 mM.

Además de los tratamientos estándares, se realizaron otras dos reacciones de desfosforilación en las que se emplearon la mitad y el doble de unidades de fosfatasa que las utilizadas para el tratamiento estándar. La eficiencia de desfosforilación en cada uno de estos tratamientos se ensayó mediante ligamientos del vector y transformación de bacterias. Se utilizó el tratamiento mínimo.

Finalizada la reacción de desfosforilación, la enzima fue inactivada calentando 15 min a 65°C. La completa inactivación de la enzima por calor permitió llevar a cabo la reacción de ligamiento empleando directamente un volumen adecuado de la reacción de desfosforilación.

#### 6.6.8.3.4. Adición de desoxiadenosinas a extremos 3' romos de moléculas de DNA

La adición de desoxiadenosinas se llevó a cabo para permitir el clonaje en el vector pGEM-T o pGEM-T *easy* (Promega, EEUU) de fragmentos de DNA de extremos romos, fundamentalmente productos de PCR amplificados con *Pfu* polimerasa ya que esta polimerasa carece de actividad transferasa terminal. El clonaje de estos productos en el vector pGEM-T requiere de la adición de una desoxiadenosina (dATP) a los extremos 3', para lo cual se utilizó la actividad transferasa terminal de la *Taq* polimerasa. Se siguieron las recomendaciones del manual del pGEM-T para llevar a cabo la reacción, empleando 1-2 µl del producto de PCR previamente aislado de gel en un volumen total de reacción de 10 µl.

#### Adición de desoxiadenosinas

<b>Producto de PCR purificado</b>	1-2 µL
<b>tampón <i>Taq</i> polimerasa</b>	1X
<b>dATP</b>	0,2 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2,5 mM
<b><i>Taq</i> DNA polimerasa</b>	5 U

La adición de desoxiadenosinas se produce mediante incubación de la mezcla anterior a 70°C durante 30 min.

#### **6.6.8.3.5. Ligamiento de moléculas de DNA**

Una vez preparados vector e inserto, se desarrolló la reacción de ligamiento entre ellos en un volumen de 10 µl con una relación de moléculas de vector:inserto de 1:3, partiendo de 100 ng de vector. Se empleó 1 U de DNA ligasa del fago T4 (Roche, Indianapolis, IN, EEUU) y el tampón de la enzima a 1X (Tris-HCl 66 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; DTT 1 mM; ATP 1 mM). Para el ligamiento de moléculas de DNA con extremos cohesivos, la mezcla de reacción se mantuvo a 4°C durante >16 h. En el caso de los extremos romos la reacción de ligamiento se dejó a temperatura ambiente >16 h. Transcurrido este tiempo se transformó una alícuota de células competentes de *E. coli* (apartado 6.4.1) con toda la reacción de ligamiento.

#### **6.6.8.3.6. Rastreo de los transformantes**

La identificación de los clones positivos portadores del plásmido deseado de entre las colonias resultantes de la transformación con el ligamiento se realizó en la mayoría de casos mediante PCR de colonia, amplificando un producto inferior a 2 Kpb. Generalmente se analizaron 6 colonias de la placa de transformantes tomando cada colonia con una punta estéril de micropipeta con cuidado de no tomar trozos del medio y se resuspendió en 8 µl de agua estéril. 4 µl se utilizaron como molde de la PCR y los otros 4 µl se reservaron para inocular medio líquido y extraer el plásmido en aquellos casos en los que la PCR dio un resultado positivo. El plásmido que fue extraído fue confirmado mediante digestiones con enzimas de restricción y/o secuenciación.

#### **6.6.8.4. Secuenciación de DNA**

La secuenciación de moléculas de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de La Laguna en el que se dispone de un sistema de secuenciación de DNA *Megabace DNA Analysis System* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido).

#### **6.6.8.5 Cuantificación relativa de la expresión génica mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)**

La técnica de PCR a tiempo real se utilizó para llevar a cabo cuantificaciones relativas de la expresión génica de varios genes en distintas condiciones. El estudio de la expresión de cada uno de estos genes fue realizado mediante amplificación de una región concreta de los mismos, denominado amplicón. El tamaño de los amplicones osciló entre los 120-200 pb. Se procuró que el tamaño de todos los amplicones fuese similar para evitar diferencias en las eficiencias de reacción que podrían conducir a errores en la cuantificación.

La PCR es la segunda parte de una técnica en la que primero se sintetiza el cDNA a partir de RNA extraído (ver apartado 6.6.4). Este cDNA es el molde de la reacción de PCR en tiempo real, de forma que una mayor cantidad de producto de PCR implica una mayor cantidad de RNA y por tanto una mayor expresión del gen que estamos estudiando

##### **6.6.8.5.1 Proceso experimental**

El uso de agentes intercalantes del DNA con propiedades fluorescentes permite monitorizar la PCR a tiempo real de forma que la señal de fluorescencia aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR sintetizado. El agente fluoróforo utilizado en este caso fue SYBR Green®. Para preparar las reacciones de PCR se utilizó el kit comercial *GeneAmp Fast PCR Master Mix* (Applied Biosystems) que proporciona una mezcla conteniendo todos los elementos necesarios para llevar a cabo la PCR (SYBR Green®, MgCl<sub>2</sub>, *Taq*, etc.) excepto los cebadores específicos y el cDNA. Las reacciones se llevaron a cabo en placas multipocillo (*Semi-Skirt Microplates*, Bio-Rad, EEUU) selladas con un film óptico autoadhesivo (*Microseal "B" Film*, Bio-Rad, EEUU) para evitar la evaporación durante la reacción. A cada uno de los pocillos se añadió una disolución que contenía los cebadores específicos, la mezcla que proporciona el kit (*Supermix*) y el cDNA en un volumen total de 20 µl. Los componentes se mantuvieron sobre hielo durante todo el proceso.

### Mezcla de PCR

- Mezcla de cebadores<sup>1</sup> 7  $\mu$ l
- *Supermix* 10  $\mu$ l
- cDNA 3  $\mu$ l

<sup>1</sup>0.5  $\mu$ l de cada cebador (0.5  $\mu$ M) y 6  $\mu$ l de agua

En cuanto a los cebadores empleados, estos tuvieron un tamaño entre de 15-20 pb. Se procuró que el porcentaje G/C entre de los mismos no superará el 70%, pues porcentajes mayores los hacen susceptibles de interacciones no específicas que pueden ser detectadas en el caso del uso de SYBRGreen y que reducen la eficiencia de la reacción. Se debe evitar la formación de estructuras secundarias en la secuencias de los cebadores así como reducir la posibilidad de formación de dímeros entre ellos. Para solventar estos inconvenientes se utilizó el programa Primer3 ([www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).

El utilizar diluciones seriadas de cDNA de cada muestra resulta muy útil a la hora de verificar la fiabilidad de los datos experimentales obtenidos. Si representamos el ciclo umbral ( $C_T$ ) de cada muestra frente a la dilución usada (1/5, 1/25, etc.) deberemos obtener una línea recta de pendiente -3.33, siempre que se haya usado un factor de dilución fijo. Cuanto más ajustada esté la línea recta a esta pendiente mayor eficiencia habrá tenido la reacción y nuestros datos tendrán una mayor fiabilidad (una pendiente de -3.33 implica una eficiencia del 100%). En la práctica se realizaron diluciones 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625 del cDNA de cada muestra. La dilución 1/5 se llevó a cabo diluyendo 5  $\mu$ l del cDNA en 25  $\mu$ l totales (disolvente agua). De estos 25  $\mu$ l se tomaron 5  $\mu$ l y se trasvasaron a otro tubo que contenía 20  $\mu$ l de agua (dilución 1/25), y así sucesivamente hasta obtener las 4 diluciones.

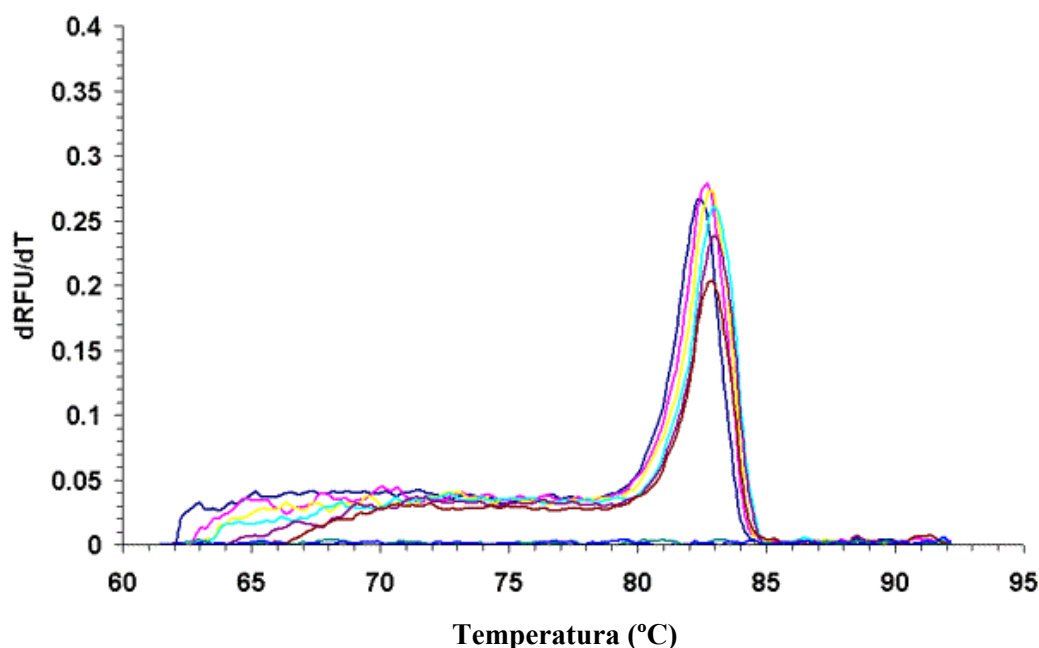
Indistintamente se llevaron a cabo reacciones en las que se comparaba la expresión de un gen en distintas cepas o condiciones experimentales o de muchos genes en una misma cepa o condición. En cualquiera de los casos, siempre se incluyó un gen de referencia para cada cepa o condición, de manera que se pudieran relativizar los resultados obtenidos para nuestros genes con los obtenidos por el gen de referencia, en nuestro caso el gen de la actina. Suponemos que la expresión de este gen no varía significativamente al variar de condición experimental o de cepa.

Finalmente, una vez colocadas todas las muestras en la placa multipocillo y sellada convenientemente, se centrifugó a 2005 rpm durante un min para eliminar cualquier tipo de burbuja presente y se llevó a cabo la reacción en un termociclador i-Cycler iQ (Bio-Rad, EEUU) en las siguientes condiciones:

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
<b>Desnaturalización</b>	95°C	2 min	1 ciclo
<b>Amplificación y cuantificación</b>	95°C	15 s	40 ciclos
	60°C	20 s	
	72°C	20 s	
<b>Fusión</b>	60°C-90°C	$\Delta 0.5^\circ\text{C/s}$	

#### 6.6.8.5.2 Determinación de la especificidad. Curvas de fusión

Como se puede apreciar en el apartado anterior, tras la amplificación se aumentó la temperatura de las muestras hasta casi los 100°C. Cuando se alcanza la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de un fragmento determinado se produce un decremento en la fluorescencia emitida, de forma que si representamos la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura frente a la temperatura (curva de fusión o de *melting*) obtendremos picos característicos para cada producto, pudiendo diferenciar en cada reacción si el producto obtenido es específico o se trata de algún artefacto generado por la presencia de dímeros de cebadores u otros contaminantes de la reacción. Estos productos no específicos suelen tener temperaturas de fusión en torno a 75-80°C, por debajo de las  $T_m$  usuales de los productos específicos (figura 4).



**Figura 4. Curva de fusión de los productos obtenidos durante una PCR.** Al representar la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura frente a la temperatura se obtienen máximos que representan la fusión de un producto. En este caso aparece un único pico a los 82,5 °C que corresponde al producto específico de la reacción. Se observa que no existen productos inespecíficos. La existencia de dímeros de primers produciría la aparición de un pico adicional a una temperatura inferior a la del amplicón.

#### 6.6.8.5.3 Método de análisis para la cuantificación relativa de la expresión génica

El análisis de la cuantificación relativa de la expresión génica se llevó a cabo de forma manual, es decir, a partir de los valores de  $C_T$  y sin utilizar programas informáticos. El valor de  $C_T$  tan sólo indica el ciclo de la PCR al que la fluorescencia emitida por una determinada muestra cruza un determinado ciclo umbral, de manera que la cuantificación de la expresión de un determinado gen va en función de la “rapidez” con la que se alcanza dicho ciclo umbral. No obstante, se deben tener otros factores en cuenta, por ejemplo los resultados obtenidos para el gen de referencia, la eficiencia de las reacciones, etc. Para ello nos basamos en el método propuesto por Pfaffl, 2001:



$$\text{Razón} = [(E_{\text{diana}})^{\Delta C_T \text{ diana}}] / [(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_T \text{ referencia}}]$$

$E_{\text{diana}}$ : Eficiencia de amplificación del gen diana con el amplicón X

$E_{\text{referencia}}$ : Eficiencia de amplificación del gen diana con el amplicón actina

$\Delta C_T \text{ diana}$ : Diferencia entre el  $C_T$  de la cepa o condición control y el de la cepa o condición problema con el amplicón X

$\Delta C_T \text{ referencia}$ : Diferencia entre el  $C_T$  de la cepa o condición control y el de la cepa o condición problema con el amplicón actina

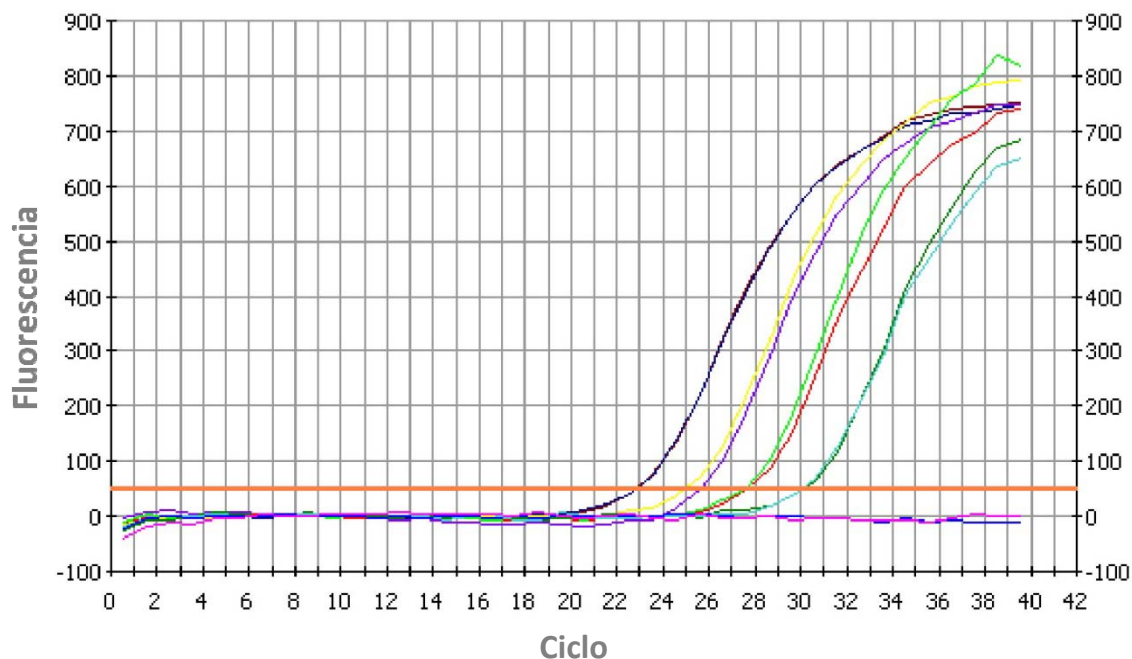
Un ejemplo real podría ser comparar la expresión del gen *YNR1* en las cepas  $\Delta cnb1$  y WT. En este caso, *YNR1* estaría representado por el amplicón X,  $\Delta cnb1$  sería la cepa problema y WT la cepa control.

Las eficiencias se calculan mediante la fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

donde E es la eficiencia de la amplificación y la pendiente es la correspondiente a representar el ciclo umbral ( $C_T$ ) de cada muestra frente a la dilución usada (1/5, 1/25, etc.).

La razón obtenida de aplicar la fórmula de Pfaffl se puede considerar como el número de veces más que se expresa el gen diana en la cepa o condición problema que en la cepa o condición control.



**Figura 5. Diagrama característico de una reacción de PCR.** Al representar la cantidad de producto obtenido, en este caso mostrado como cantidad de fluorescencia, frente a los ciclos de la PCR se obtiene una curva exponencial típica. La zona idónea de esta curva para comparar fluorescencias es al principio de la fase exponencial. Si trazamos una línea (roja en la figura) paralela al eje de abscisas cortará a cada curva en un ciclo determinado. Ese ciclo se denomina ciclo umbral ( $C_T$ ) y es característico para cada muestra. El que una muestra A alcance el ciclo umbral un ciclo antes que otra muestra B significa que la muestra A contiene el doble de mRNA que la B y que a efectos de cuantificación relativa la muestra A se expresa el doble que la muestra B.

## 6.7 Metodología específica desarrollada en la realización de este trabajo

### 6.7.1 Expresión del gen *URE2* de *H. polymorpha* en *E. coli*. Purificación de la proteína.

#### 6.7.1.1 Sistema de expresión

Se utilizaron los vectores de expresión de la serie *pRSET* (Invitrogen corporation, USA). Los vectores *pRSET* son derivados de los vectores de expresión *pUC*, diseñados para la expresión proteica en *E. coli*. Los elevados niveles de expresión de secuencias de DNA clonadas en los vectores *pRSET*, se deben a la presencia del promotor del fago T7. Los fragmentos de DNA son clonados en fase y “downstream” a una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de fusión. Esta secuencia, en dirección 5'- 3' (desde el extremo N-terminal al C-terminal) contiene los siguientes

elementos: un codón ATG de iniciación de la traducción, una región nucleotídica que codifica seis histidinas que funcionan como un dominio de unión a níquel en la proteína de fusión, una secuencia del gen 10 del fago T7 estabilizante del transcrito y una región nucleotídica que codifica una secuencia de corte proteolítico reconocida por la enteroquinasa. El dominio de unión a metal permite la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad a níquel. El sitio de reconocimiento de corte de la enteroquinasa permite liberar el péptido de fusión de la proteína recombinante.

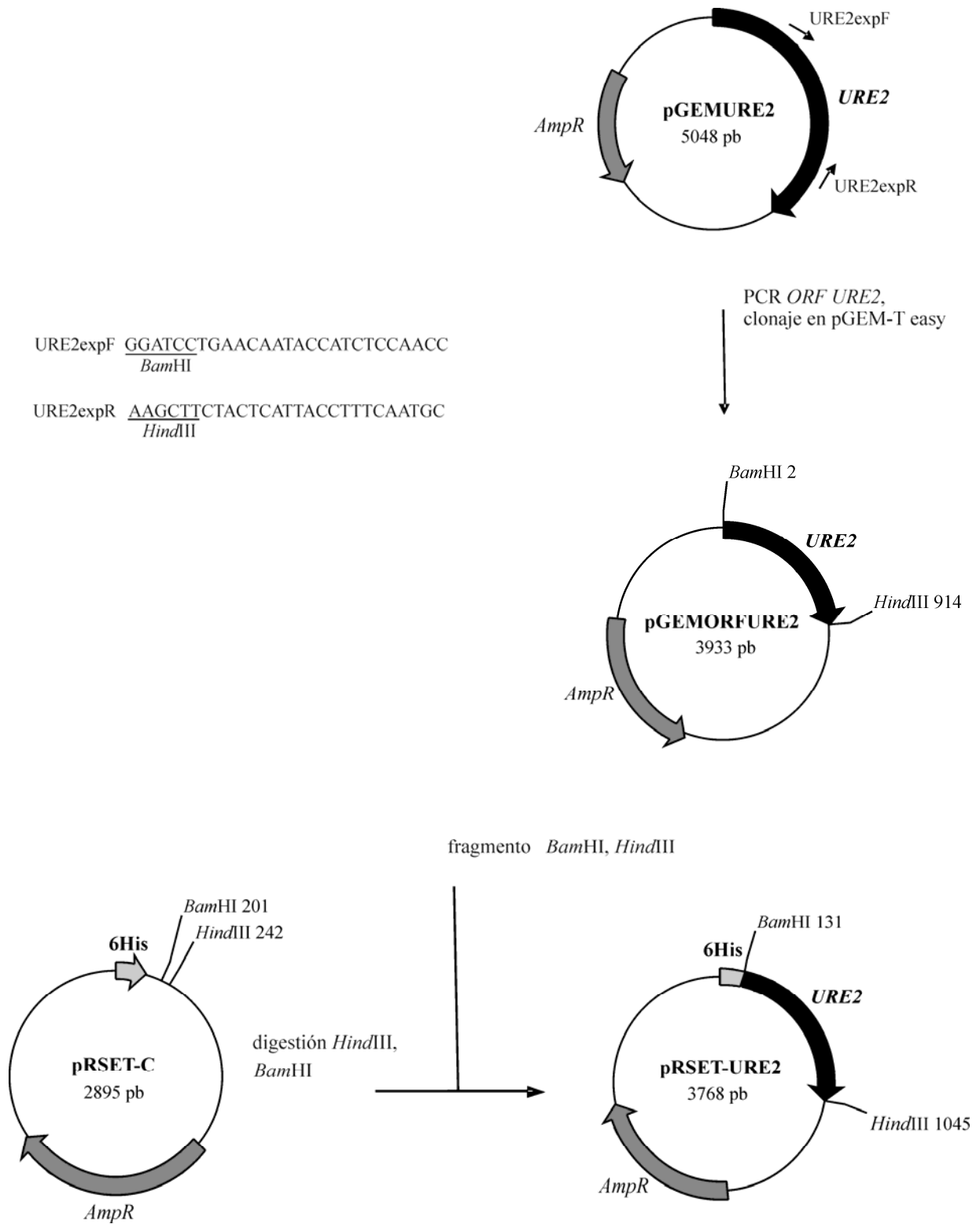
Los vectores *pRSET* poseen un sitio múltiple de clonaje con diez lugares de corte para endonucleasas de restricción. Para clonar en fase el fragmento de DNA dentro del sitio múltiple de clonaje con el codón de iniciación ATG, existen tres versiones diferentes del vector: *pRSET A*, *pRSET B* y *pRSET C*. Cada uno de estos vectores difiere sólo en el espacio existente entre la secuencia que codifica el péptido de fusión y el sitio múltiple de clonaje. Eligiendo adecuadamente la endonucleasa de restricción y sabiendo que en cada uno de los vectores la pauta de lectura varía para cada endonucleasa, es posible clonar en fase un fragmento de DNA.

La cepa *E. coli* BL21(DE3) fue usada para la expresión de proteínas. Esta cepa carece de las proteasas *Lon* y *OmpT* que pueden degradar las proteínas durante su expresión y purificación. Además contiene el bacteriófago DE3 integrado en su genoma; éste es un derivado del fago  $\lambda$  y posee el gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7 fusionada en fase al promotor *lacUV5*. Este promotor es inducido por la presencia de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Por tanto, la adición de IPTG a un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) induce la expresión de la RNA polimerasa de T7 y ésta promueve la transcripción del fragmento de DNA clonado en el vector de expresión.

La T7 RNA polimerasa posee un nivel de expresión basal sin que exista inducción mediada por IPTG. La presencia de la polimerasa en cultivos que expresan proteínas tóxicas para *E. coli* pueden originar una expresión nula de la proteína de interés. Sin embargo existe un inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa, la lisozima de T7. Ésta está contenida en un plásmido que contiene resistencia a cloranfenicol. En caso de que se transcriba a partir del promotor tet, se denomina *pLysE*; cuando la orientación es la contraria se denomina *pLysS*.

### 6.7.1.2 Construcción del plásmido pRSET-URE2

En primer lugar se amplificó la ORF completa del gen *URE2* mediante PCR con Pfu con los oligos URE2expF y URE2expR, que incorporan las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III respectivamente, usando como molde el plásmido pGEM-URE2. Este fragmento se clonó en pGEM-T para obtener el plásmido pGEMORFURE2. Finalmente para construir el plásmido pRSET-URE2 el fragmento *Bam*HI-*Hind*III conteniendo la ORF del gen *URE2* procedente de pGEMORFURE2 se insertó en los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pRSET-C. Este plásmido se usó para la expresión de *URE2* en *E. coli*.



**Figura 6. Construcción del plásmido pRSET-URE2.** El plásmido contiene la ORF del gen *URE2* clonado en fase al epítipo 6His.

### 6.7.1.3 Expresión de la proteína

Una vez obtenido el plásmido pRSET-URE2 se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol.

Se inocularon 5 ml de LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol con una colonia y se dejó crecer a 37°C toda la noche hasta la saturación ( $OD_{595} > 2$ ). Los cultivos crecidos durante la noche se utilizaron para inocular medio LB fresco conteniendo ampicilina a una  $OD_{595}$  de 0.05-0.1 (dilución 1:50 del cultivo). En este punto se tomaron 600  $\mu$ l de cultivo para hacer un stock a -80°C de las cepas previa adición de 600  $\mu$ l de glicerol al 30% (p/v). Los cultivos se crecieron hasta que alcanzaron una  $DO_{595} \sim 0.4$  (2 a 3 horas) momento en el cual se indujeron con IPTG 0.5 mM manteniéndolas a 37°C con agitación vigorosa durante 3 horas. Antes de la inducción se tomaron 200  $\mu$ l y 400  $\mu$ l de cultivo que se centrifugaron durante 1 minuto a 13000 rpm, se lavó el sedimento con agua y se guardó congelado a -20°C (muestra no inducida). Tras la inducción se tomó otra muestra de 200  $\mu$ l y 400  $\mu$ l y se congeló a -20°C (muestra inducida). La expresión de la proteína de fusión Ure2p se comprobó mediante SDS-PAGE 12%. Las muestras inducidas y no inducidas se prepararon resuspendiendo el sedimento en 20  $\mu$ l de LSB 1x y calentándolas a 95°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Para la expresión preparativa de las proteínas se inocularon 50 ml de LB con la cepa procedente del stock congelado. Tras la inducción las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. Tras desechar el sobrenadante se congelaron a -80°C hasta su utilización.

### 6.7.1.4 Purificación de la proteína bajo condiciones nativas

Las células se descongelaron en hielo durante 15 minutos y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis.

A continuación se añadió lisozima a una concentración de 1 mg/ml y se incubaron las células 30 minutos en hielo. Seguidamente las células fueron sonicadas a 300 W 6 veces en periodos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos en hielo. Los lisados celulares se centrifugaron durante 30 minutos a 14000 rpm y se tomaron los sobrenadantes. En este punto se tomaron 16 µl de sobrenadante para el análisis mediante SDS-PAGE de la rotura celular (muestra 1). Antes de añadir los lisados celulares a las columnas Ni-NTA (Qiagen) éstas fueron preequilibradas con 600 µl de tampón de lisis<sup>(34)</sup> y centrifugadas durante 2 minutos a 2000 rpm. Después se añadieron a las columnas los lisados celulares conteniendo la proteína Ure2 etiquetada con las seis histidinas y se centrifugaron nuevamente durante 2 minutos a 2000 rpm. En este punto se tomaron 16 µl del filtrado para el análisis mediante SDS-PAGE de la eficiencia de unión de la proteína a la columna (muestra 2). Las columnas se lavaron tres veces con 600 µl de tampón de lavado<sup>(35)</sup> centrifugando durante 2 minutos a 2000 rpm. Para comprobar la eficacia de los lavados se tomaron 16 µl de cada uno de los filtrados para su análisis mediante SDS-PAGE (muestras 3,4 y 5).

Finalmente las proteínas se eluyeron hasta cuatro veces con 200 µl de tampón de elución<sup>(36)</sup> mediante centrifugación durante 2 minutos a 2000 rpm. La mayoría de la proteína eluye en los primeros 200 µl de eluido. En este punto se reservaron 20 µl de cada eluido para analizar mediante SDS-PAGE (muestras 6,7,8 y 9).

Las muestras se prepararon añadiendo 4 µl de LSB 5x a los 16 µl recolectados y calentándolas durante 10 minutos a 95°C. La purificación de la proteína Ure2 se comprobó mediante SDS-PAGE al 12% y tinción con Coomassie Blue al 0.05 %.

La cuantificación de la proteína purificada se llevó a cabo según el método descrito por Bradford (1976) usando  $\gamma$ -globulina como patrón.

### **6.7.2 Determinación de la actividad glutatión peroxidasa**

Para determinar la actividad glutatión peroxidasa de la proteína Ure2, las muestras purificadas, almacenadas a -80 °C, se descongelaron en un baño a 25°C inmediatamente antes de su uso.

La actividad glutatión peroxidasa se midió indirectamente mediante una reacción acoplada con la enzima glutatión reductasa. El glutatión oxidado (GSSG) producido en la reducción del hidróperóxido por la glutatión peroxidasa es reciclado a su estado

reducido por la glutatión reductasa (GR) y el NADPH. La oxidación del NADPH a  $\text{NADP}^+$  se determinó por la disminución de la absorbancia a 340 nm.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un volumen de reacción de 1 ml conteniendo 100 mM de fosfato sódico pH 7.5, 4 mM de azida sódica, 1 mM de GSH, 0,15 mM de NADPH, 0,24 U de glutatión reductasa y 0,5-2  $\mu\text{M}$  de Ure2. La reacción se disparó mediante la adición de distintos hidroperóxidos. El progreso de la reacción fue monitorizado mediante el seguimiento de la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm. Los valores de velocidad inicial se determinaron a partir de la zona lineal de la curva con un coeficiente de extinción molar para el NADPH de  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  tras sustraer las velocidades no enzimáticas debidas a la autoxidación del GSH por el hidroperóxido determinadas con el control correspondiente. Cuando el GSH se omitió del ensayo, no se observó actividad.

#### **6.7.3 Determinación de la actividad glutatión S-transferasa.**

También se determinó la actividad glutatión S-transferasa también se utilizó la proteína Ure2 purificada. El ensayo se realizó a 25°C en un volumen de reacción de 1 ml conteniendo 100 mM de fosfato potásico pH 6.5, 1 mM de GSH y varias concentraciones de CDNB y ácido etacrínico. La reacción se siguió mediante el aumento de la absorbancia a 340 nm (en el caso del CDNB) y a 270 nm (en el caso del ácido etacrínico) causada por la formación de S-conjugados. La actividad GST se calculó usando un coeficiente de extinción molar de  $5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el ácido etacrínico y un coeficiente de extinción molar de  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el CDNB.

#### **6.7.4 Medida del contenido de calcio intracelular mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama.**

El método de Absorción Atómica con Llama se usó para la determinación de calcio en extractos totales de células. Las medidas se llevaron a cabo en el Servicio de Espectroscopía de Absorción atómica de la Universidad de La Laguna en el que se dispone de un Espectrofotómetro de Absorción atómica con atomización por llama de aire/acetileno y protóxido de nitrógeno/acetileno Varian 220 FS.

La absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente metales como: cadmio, calcio, cesio, cromo, cobalto, plomo, níquel,



etc. Sus campos de aplicación son por tanto muy diversos. Se emplea en el análisis de aguas, de suelos, bioquímica, toxicología, medicina, industria farmacéutica, industria alimenticia, industria petroquímica, etc.

Este método consiste en la determinación de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los diferentes procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados. La técnica de atomización más usada es la de Absorción Atómica con Llama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de una llama de aire acetileno u óxido nitroso-acetileno.

#### **6.7.4.1 Instrumentos para la espectrofotometría de absorción atómica**

En esencia el equipo de absorción atómica consta de tres partes: una fuente de radiación, un medio para la obtención de átomos libres y un sistema para medir el grado de absorción de la radiación.

➤ Fuente de radiación:

La fuente de radiación característica debe poseer tres propiedades fundamentales:

- Monocromaticidad: la línea de resonancia se debe poder seleccionar con toda precisión exactamente a la longitud de onda del elemento a determinar.
- Intensidad: deber ser lo suficientemente intensa a la longitud de onda de interés.
- Estabilidad: suficiente como para poder realizar las medidas sin fluctuaciones.

Actualmente hay varias fuentes de radiación utilizables: las de emisión continua, que abarcan el espectro desde el ultravioleta lejano hasta el visible y las fuentes de emisión discontinua, que emiten únicamente a longitudes de onda muy concretas. Las fuentes de emisión continua son muy buenas, pero necesitan un monocromador de un elevado poder de resolución cuyo precio es muy alto. Por esta razón son más utilizadas las fuentes de emisión discontinua, entre las que se pueden distinguir las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos. Tanto unas como otras requieren un período de calentamiento antes de comenzar las mediciones. Sin embargo, se debe destacar que las lámparas de descarga sin electrodos tienen un elevado precio y

requieren un elevado tiempo de calentamiento, pero presentan la ventaja de alta intensidad de emisión frente a las lámparas de cátodo hueco.

➤ Atomizadores con llama

Su función es convertir los átomos combinados de la muestra en átomos en estado fundamental, para ello es necesario suministrar a las muestras una cantidad de energía suficiente para disociar las moléculas, romper sus enlaces y llevar los átomos al estado fundamental. Los componentes necesarios para obtener los átomos en estado fundamental son:

- Nebulizador: cuya misión es convertir la muestra aspirada en una nube de tamaño de gota muy pequeño.

- Cámara de premezcla: donde penetra la muestra una vez se ha nebulizado. En ella se separan las pequeñas gotitas que forman la niebla mezclándose la muestra nebulizada con el oxidante y el combustible.

- Mechero. Se sitúa sobre la cámara de premezcla, y por él sale la llama con temperatura suficiente para poder comunicar a la muestra la energía suficiente para llevar los átomos a su estado fundamental.

- La llama es el medio de aporte de energía a la muestra. Entre las llamas se diferencia entre la de aire-acetileno y la de óxido nitroso-acetileno. En la llama se pueden distinguir tres zonas:

- La zona interna: es la más próxima al mechero, de color azul y con temperatura relativamente baja.

- La zona de reacción: donde se produce la atomización.

- La zona externa: Es la parte más fría de la llama.

➤ Monocromadores

Tienen como función seleccionar la línea de absorción, separándola de las otras líneas de emisión emitidas por el cátodo hueco.

➤ Detectores

Miden la intensidad de la radiación antes y después de la absorción por la muestra. A partir de los valores obtenidos se podrá calcular la radiación absorbida. Se emplean tubos fotomultiplicadores. La llama emite energía continuamente a longitudes

de onda no deseadas, produciendo interferencia y una gran inestabilidad en las lecturas. Los detectores que se utilizan son sensibles a determinadas frecuencias, ignorando las señales continuas ocasionadas por la llama. Por ello, se modula el sistema de alimentación de las lámparas a la misma frecuencia que el tubo fotomultiplicador.

➤ Sistema óptico

Su función es conducir las radiaciones emitidas por la lámpara a través del sistema de obtención de átomos en estado fundamental y el monocromador hasta llegar al detector. El sistema óptico está formado por:

- Espejos y lentes, que focalizan sobre la llama la mayor cantidad de energía emitida por la lámpara y la sitúan a la entrada del monocromador.

- Láminas planoparalelas, que se utilizan para aislar los demás elementos del exterior.

- Rendijas que se sitúan una a la entrada para obtener un haz paralelo y estrecho procedente de la lámpara y otra a la salida para seleccionar la longitud de onda adecuada eliminando el resto de las emisiones. De acuerdo con el sistema óptico, los espectrofotómetros de absorción atómica pueden ser de doble haz y de haz simple. En los espectrofotómetros de doble haz parte de la radiación pasa a través de la muestra y otra parte va directamente al detector. Estos equipos presentan la ventaja de que las variaciones de la intensidad de la fuente de radiación son compensadas automáticamente.

#### 6.7.4.2 Incremento de la sensibilidad

En ocasiones, las concentraciones que deseamos detectar son demasiado bajas, por lo que debemos recurrir a técnicas especiales que requieren complementar el equipo con ciertos accesorios, los cuales mejoran notablemente la sensibilidad del equipo. Algunos ejemplos de ellos son los siguientes:

➤ **Cámara de grafito.**

El aporte energético más utilizado es la llama, pero en ocasiones se necesita mayor sensibilidad. Una forma de controlar las etapas necesarias para llevar los átomos que constituyen una muestra hasta el estado fundamental es suministrar la energía por medios electrotérmicos. Es decir, sustituimos la llama por la cámara de grafito. Con ello

aumenta la proporción de átomos en estado fundamental y, por tanto, la sensibilidad aumenta. Con la cámara de grafito se aumenta la sensibilidad unas 1000 veces la de la llama, pudiéndose llegar a detectar niveles de ng/L.

#### 6.7.4.3 Método de análisis

El análisis de una muestra determinada se inicia fijando los parámetros específicos del elemento que vamos a analizar. Estos parámetros vienen especificadas por el fabricante. Una vez elegidas las condiciones de trabajo para el elemento en cuestión habrá que calibrar el instrumento. Para ello se pueden seguir dos procedimientos, la realización de una curva de calibrado o bien el método de adición.

- Curva de calibrado.

Se utilizan disoluciones patrones del elemento a determinar a determinadas concentraciones. Se representa la absorbancia de cada solución patrón frente a la concentración. Se procura trabajar en el intervalo lineal de la curva. Una vez obtenida la curva patrón, se atomiza la muestra problema y se mide la absorción de la misma, utilizando idénticas condiciones a las usadas cuando se preparó la curva patrón. De la medida de la absorbancia del problema se puede determinar su concentración a partir de la curva de calibrado por interpolación.

- Método de adición.

Este método se emplea cuando existen interferencias. El método consiste en añadir un volumen conocido de la muestra problema a cuatro matraces aforados. Al primer matraz no se le añade nada. Al segundo se le añade por ejemplo 1 ppm. Al tercer matraz se le añade un volumen doble del mismo patrón, de forma que contenga una concentración añadida de 2 ppm. Y al cuarto matraz se le añade 3 ppm. Una vez hecho esto, se procede a realizar las medidas de absorbancia de cada matraz. El primer matraz dará una lectura, el segundo matraz dará la misma lectura que el anterior más la señal propia de 1 ppm. Extrapolando sobre el eje negativo de las X se encuentra el valor de la concentración de la muestra desconocida. Para que este método sea válido se debe obtener una curva de calibrado perfectamente recta.

#### **6.7.4.4 Obtención de extractos totales para la determinación de calcio intracelular mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica.**

Los cultivos se inocularon normalmente en YGNH a partir de precultivos, crecidos hasta saturación en YPD, a una DO de 0,075 ( $\approx$  0,28 mg de células/ ml). Se crecieron durante 4-5 horas hasta una DO de 0,3 ( $\approx$  1 mg de células / ml) y se recogieron aproximadamente 3 mg de células mediante filtración por vacío en filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,8  $\mu$ m (Millipore). Las células fueron lavadas 2 veces haciendo pasar por el filtro 5 ml de disolución de lavado bien fría ( $\text{MgCl}_2$  100 mM). Tras los lavados las células se transfirieron a un nuevo filtro mediante la resuspensión de las células contenidas en el primer filtro en 5 ml de disolución de lavado en un tubo falcon de 50 ml y su pipeteo sobre el segundo filtro. Las células se lavaron una última vez. Las células se resuspendieron en 5 ml de HCl 0,1 M para su lisis ácida tras lo cual se tomaron 3 alícuotas de 200  $\mu$ l para la determinación de la densidad óptica del cultivo tras el procesamiento. Finalmente se incubaron toda la noche con agitación suave. Las muestras se centrifugaron 7 minutos a 4.863 x g (5000 rpm) para eliminar los restos celulares y el calcio se determinó en los sobrenadantes. Con el fin de calibrar el espectrofotómetro de absorción atómica se realizó una curva de calibrado con las siguientes soluciones patrones: 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 3 ppm de calcio. A las soluciones patrones se añadió potasio para minimizar las posibles interferencias por ionización del calcio. Una vez obtenidas las medidas se calcularon los nmoles de calcio por mg de células.

## MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y DISOLUCIONES

### Medios de cultivo bacterianos

#### 1 - Medio LB

- Triptona 1% (p/v) (Pronadisa, España)
- Extracto de levadura 0,5% (p/v) (Panreac, España)
- NaCl 1% (p/v)

Ajustado a pH 7 con NaOH.

#### 2 - Medio SOB (1)

- Triptona 2% ( p/v)
- Extracto de levadura 0,5% (p/v)
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- MgSO<sub>4</sub> 10 mM

#### 3 - Medio SOC (1)

- Triptona 2% ( p/v)
- Extracto de levadura 0,5% (p/v)
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- MgSO<sub>4</sub> 10 mM
- Glucosa 20 mM

<sup>1</sup>El cloruro y sulfato magnésico se añadieron al medio esterilizado mediante autoclave a partir de disoluciones concentradas estériles.

### Medios de cultivo de levaduras

#### 4 - YPD

Extracto de levadura 1% (p/v)  
Peptona 2% (p/v)  
Glucosa 2% (p/v)

#### 5 - YG

Yeast nitrogen base without aminoacids  
and ammonium sulphate 0,17% (p/v)  
Glucose 2% (p/v)

### **Preparación de células competentes de bacterias**

#### **6 - Tampón RF1:**

- RbCl 100 mM
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  50 mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mM
- Glicerol al 15% (p/v).
- Acetato potásico-ácido acético 30 mM pH 5,8

#### **7 - Tampón RF2:**

- RbCl 10 mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  75 mM
- Glicerol al 15 % (p/v).
- MOPS -NaOH 10 mM pH 6.8
- 

### **Preparación de células competentes de levaduras**

#### **8 – Tampón STM:**

- Sacarosa 270 mM
- $\text{MgCl}_2$  1 mM
- Tris-HCl 10mM pH 7.5

### **Determinación Actividad NR y $\beta$ -galactosidasa**

#### **9 - Tampón de extracción**

- FAD 20  $\mu\text{M}$
- EDTA 1mM
- Tampón fosfato 100 mM, pH 7,4

#### **10 - Tampón de ensayo NR**

- FAD 40  $\mu\text{M}$
- $\text{NaNO}_3$  40 mM
- Tampón fosfato 100 mM, pH 7,4

#### **11 - Tampón de ensayo $\beta$ -galactosidasa (Tampón Z)**

- KCl 10 mM
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1 mM
- $\beta$ -mercaptoetanol 0.27 (v/v)
- Tampón fosfato 100 mM pH 7

### **Determinación Actividad Pma1**

#### **12 - Tampón de lisis Pma1**

- Tris-HCl pH 8 10 mM
- EDTA 1 mM

#### **13 - Tampón de resuspensión**

- Tris-HCl pH 7.6 10 mM
- EDTA 1 mM
- DTT 1 mM

#### **14 - Tampón de ensayo (Tampón PM-ATPasa)**

- MES-Tris pH 6.5 50 mM
- MgSO<sub>4</sub> 5 mM
- KNO<sub>3</sub> 50 mM
- NaN<sub>3</sub> 5 mM
- Molibdato amónico 0,2 mM

#### **15 - Reactivo Pi**

- Ácido sulfúrico 2 %
- Molibdato amónico 0,5 %
- SDS 0,5 %
- Ácido ascórbico 10%

### **Obtención de extractos de proteínas**

#### **16 -Tampón de extracción**

- EDTA 15 mM
- EGTA 15 mM
- Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>PO<sub>7</sub> 10 mM
- NaN<sub>3</sub> 10 mM
- NaF 10 mM
- Inhibidores de proteasas *Complete Mini*
- PMSF 2 mM
- Tris-HCl 50 mM pH 7,5



**17 - Tampón de desnaturalización (4X)**

- SDS 12% (p/v)
- $\beta$ -mercaptoetanol 6% (v/v)
- Glicerol 30% (v/v)
- Azul de bromofenol 0,05% (p/v)
- Tris-HCl 150 mM pH 7

**18 - Tampón de reacción de  $\lambda$ -proteína fosfatasa**

- EDTA 0,1mM
- DTT 5 mM
- Brij35 0,01% (p/v)
- Tris-HCl 50 mM pH 7,5

**SDS-PAGE**

**19 - Acrilamida-bisacrilamida 30% T, 2,67 % C**

- acrilamida 29,2 % (p/v)
- N'N'-bis-metilén-acrilamida 0,8 % (p/v)

**20 - Gel de compactación**

- 4% (p/v) de monómero total
- Tris-HCl 0,125 M pH 6,8
- SDS 0,1 % (p/v)

**21 - Gel de resolución**

- 8 a 12 % (p/v) de monómero total (según la aplicación)
- Tris-HCl 0,375 M pH 8,8
- SDS 0,1 % (p/v)

**22 - Tampón de electroforesis (pH 8,3)**

- Tris 25 mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0,1 % (p/v)

**23 - Disolución de tinte Coomassie**

- Coomassie brilliant blue R-250 0,1% (p/v)
- metanol 50% (v/v)
- ácido acético 7% (v/v)

**24 - Disolución de tinte I**

- metanol 50% (v/v)
- ácido acético 7% (v/v)

**25 - Disolución de tinte II**

- metanol 90 % (v/v)
- ácido acético 10% (v/v)

**26 - Tampón de transferencia (pH 8,3)**

- Tris 25 mM
- glicina 192 mM
- metanol 20 % (v/v)

**27 - PBS-T (pH 7,4)**

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,78 mM
- NaCl 136 mM
- KCl 2,7 mM
- Tween®20 0,1 % (v/v)

**Extracción DNA plasmídico**

**28 - Tampón STET**

Sacarosa 0,292 M  
EDTA 50 mM  
Tritón X-100 1% (p/v)  
Tris-HCl 50 mM pH 8

### **Extracción de DNA total de levadura**

#### **29 - Tampón de lisis**

- EDTA 50 mM
- SDS 1% (p/v)
- Tris-HCl 100 mM pH 8

### **Digestión de DNA con endonucleasas de restricción**

#### **30 – Tampón OPA (10X)**

- Tris-acetato 100 mM pH 7,5
- Acetato magnésico 100 mM
- Acetato potásico 500 mM

### **Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

#### **31 - Tampón TAE 50X (pH 8)**

- Tris 2 M
- Ácido acético glacial 5,7% (v/v)
- EDTA 50 mM

#### **32 – Tampón de carga 10X**

- Glicerol 50% (v/v)
- EDTA 1 mM
- Azul de bromofenol 0,25% (p/v)
- Verde de xilén cianol 0,25% (p/v)

### **Extracción RNA de levadura**

#### **33 - Tampón de DNasa I (10X)**

- Tris-HCl 100 mM pH 7.5
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- CaCl<sub>2</sub> 5 mM

### **Purificación de proteína recombinante**

#### **34 – Tampón de lisis**

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8
- NaCl 300 mM
- Imidazol 10 mM

#### **35 - Tampón de lavado**

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8
- NaCl 300 mM
- Imidazol 20 mM

#### **36 - Tampón de elución**

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8
- NaCl 300 mM
- Imidazol 250 mM

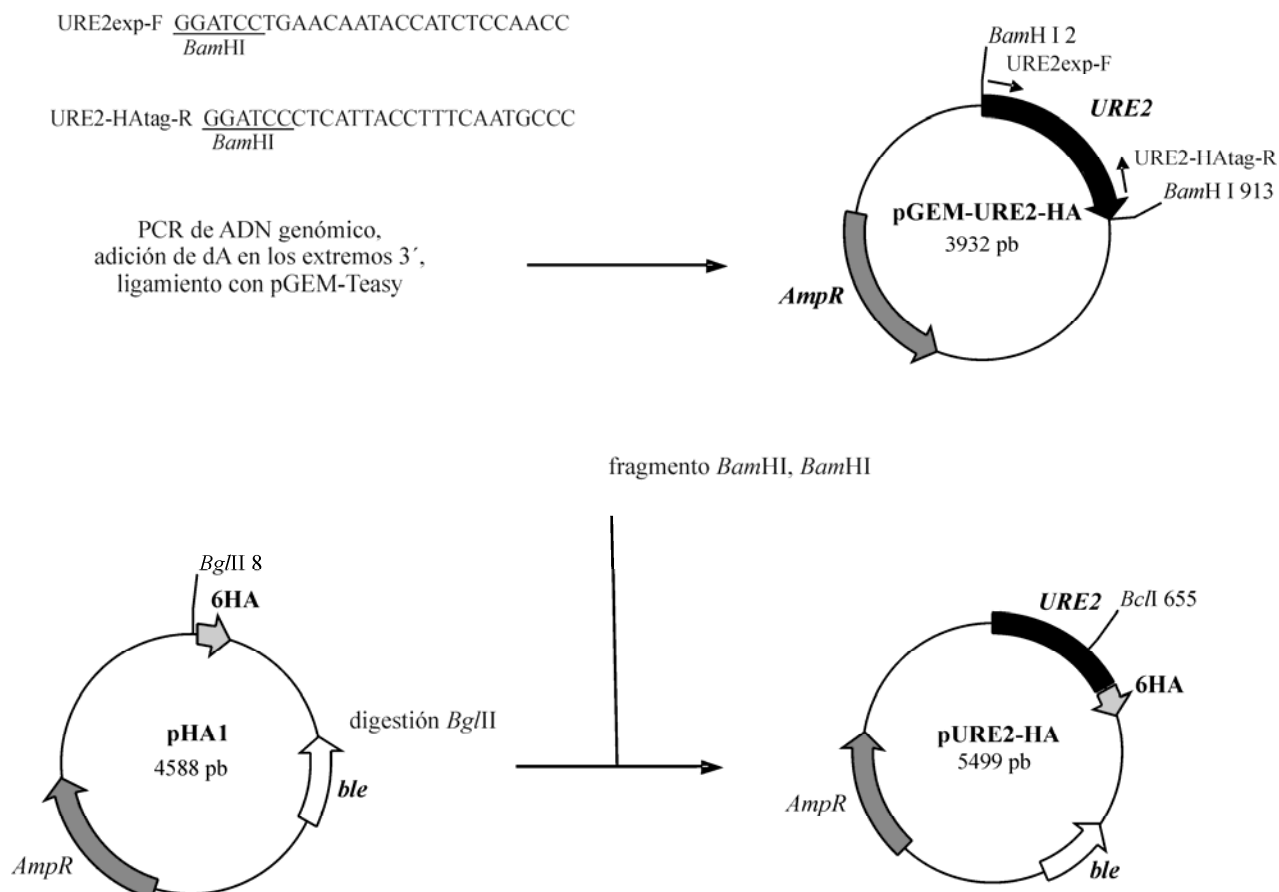
## 6.7.5 Plásmidos construidos en este trabajo.

### 6.7.5.1 Sistema de etiquetado de proteínas.

Con el fin de poder analizar mediante técnicas inmunológicas distintas proteínas sin necesidad de purificarlas y de obtener anticuerpos, se utilizó el plásmido pHA1 (Martín, 2008) que permite unir a la proteína de interés varias copias del epítipo HA. Este plásmido deriva de pANL31 que contiene la ORF de la proteína verde fluorescente, *eGFP* y el gen de resistencia a zeocina (*ble*). La secuencia *eGFP* se reemplazó por un fragmento de 256 pb que contenía seis copias del epítipo HA obtenido mediante PCR con los oligonucleótidos tagF y tagR a partir del plásmido pYM3.

#### 6.7.5.1.1 Etiquetado de Ure2 con el epítipo HA.

Para el etiquetado de Ure2 con el epítipo HA se construyó el plásmido pURE2-HA. En primer lugar se clonó en pGEM-T easy un fragmento de 905 pb de *URE2* que contenía la región codificante del gen sin codón de parada amplificado de DNA genómico usando los oligos Ure2exp-F y Ure2-HAtag-R. Ambos oligos incorporaban una diana de restricción para *Bam*HI. Posteriormente, se linealizó el plásmido pHA1 con la enzima *Bgl*II y se obtuvo a partir de pGEM-URE2-HA el fragmento *Bam*HI-*Bam*HI que incluye la secuencia de *URE2* insertada anteriormente. El clonaje de la secuencia así como su correcta orientación se comprobó mediante patrón de restricción y PCR con los oligos Ure2exp-F, utilizado para el clonaje en pGEM-T easy, y tagR, que hibrida en el epítipo HA. El resultado es el plásmido pURE2-HA en el cual se encuentra una copia de la pauta abierta de lectura de *URE2* clonada en fase a la secuencia de 6HA en su extremo 3'. Su integración en el genoma de la levadura se dirigió hacia el *locus* del gen *URE2* mediante digestión del plásmido con la enzima *Bcl*II que corta específicamente en *URE2*. El etiquetado se comprobó mediante PCR con un oligo que hibrida por fuera de la secuencia utilizada para la construcción, C-URE2 -F y con tagR.

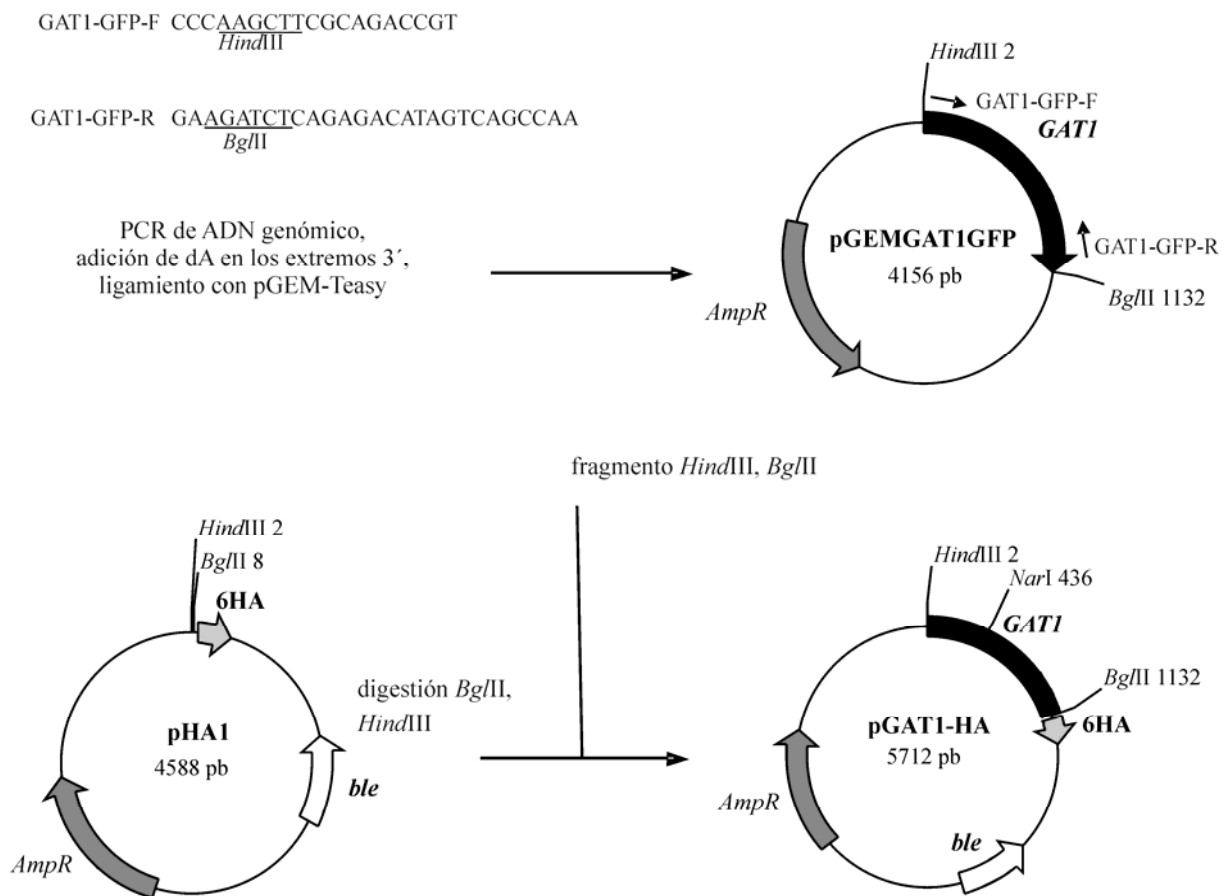


**Figura 7. Construcción del plásmido pURE2-HA.** Este plásmido contiene un fragmento de 905 pb de la ORF del gen *URE2* (en negro) clonado en fase al epítipo 6HA (en gris). El vector contiene además el casete marcador de resistencia a zeocina (*ble*) y de resistencia a ampicilina.

#### 6.7.5.1.2 Etiquetado de Gat1 con el epítipo HA.

Para el etiquetado de Gat1 con el epítipo HA se construyó el plásmido pGAT1-HA. En primer lugar se clonó en pGEM-T easy un fragmento de 1122 pb de *GAT1* que contenía la región codificante del gen sin codón de parada amplificado de DNA genómico usando los oligos GAT1GFP-F and GAT1GFP-R. Estos oligos incorporaban dianas de restricción para *Hind*III y *Bgl*II, respectivamente. Posteriormente, se cortó tanto el plásmido pHA1 como pGEMGAT1GFP con dichas enzimas. El clonaje se comprobó mediante patrón de restricción y PCR con los oligos GAT1GFP-F, utilizado para el clonaje en pGEM-T easy, y tagR, que hibrida en el epítipo HA. El resultado es el plásmido pGAT1-HA en el cual se encuentra una copia de la pauta abierta de lectura

de *GATI* clonada en fase a la secuencia de 6HA en su extremo 3'. Su integración en el genoma de la levadura se dirigió hacia el *locus* del gen *GATI* mediante digestión del plásmido con la enzima *NarI* que corta específicamente en *GATI*. El etiquetado se comprobó mediante PCR con un oligo que hibrida por fuera de la secuencia utilizada para la construcción, C-GAT1-F y con tagR.

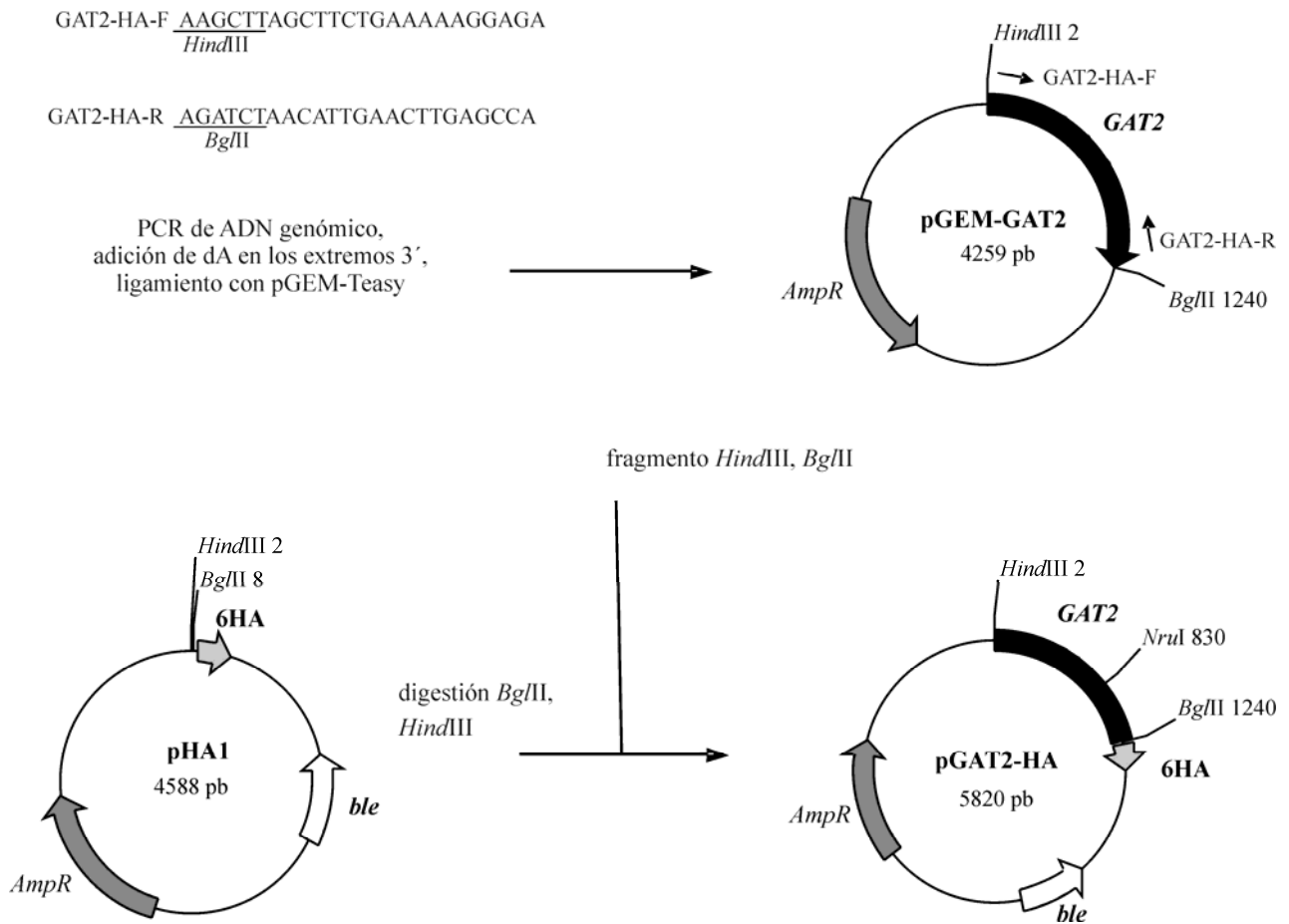


**Figura 8. Construcción del plásmido pGAT1-HA.** Este plásmido contiene un fragmento de 1121 pb de la ORF del gen *GATI* (en negro) clonado en fase al epítipo 6HA (en gris). El vector contiene además el casete marcador de resistencia a zeocina (*ble*) y de resistencia a ampicilina.

### 6.7.5.1.3 Etiquetado de Gat2 con el epítipo HA.

Para el etiquetado de Gat2 con el epítipo HA se construyó el plásmido pGAT2-HA. En primer lugar se clonó en pGEM-T easy un fragmento de 1232 pb de *GAT2* que contenía la región codificante del gen sin codón de parada amplificado de DNA genómico usando los oligos GAT2-HA-F y GAT2-HA-R. Estos oligos incorporaban dianas de restricción para *HindIII* y *BglII*, respectivamente. Posteriormente, se cortó tanto el plásmido pHA1 como pGEM-GAT2 con dichas enzimas. El clonaje se comprobó mediante patrón de restricción y PCR con los oligos GAT2-HA-F, utilizado para el clonaje en pGEM-T easy, y tagR, que hibrida en el epítipo HA. El resultado es el plásmido pGAT2-HA en el cual se encuentra una copia de la pauta abierta de lectura de *GAT2* clonada en fase a la secuencia de 6HA en su extremo 3'. Su integración en el genoma de la levadura se dirigió hacia el *locus* del gen *GAT2* mediante digestión del plásmido con la enzima *NruI* que corta específicamente en *GAT2*. El etiquetado se comprobó mediante PCR con un oligo que hibrida por fuera de la secuencia utilizada para la construcción, RT-DAL80-F y con tagR.

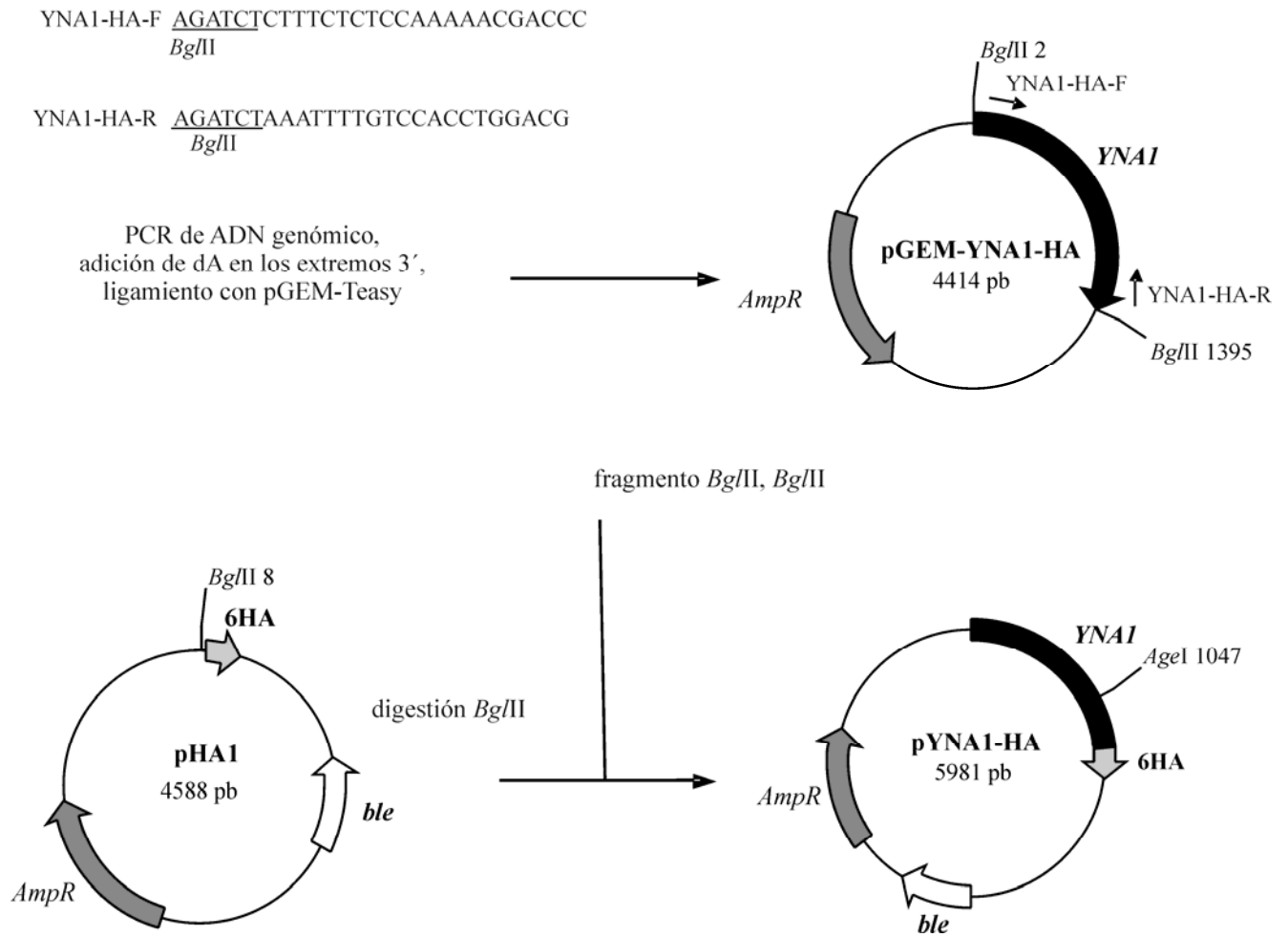




**Figura 9. Construcción del plásmido pGAT2-HA.** Este plásmido contiene un fragmento de 1244 pb de la ORF del gen *GAT2* (en negro) clonado en fase al epítipo 6HA (en gris). El vector contiene además el casete marcador de resistencia a zeocina (*ble*) y de resistencia a ampicilina.

#### 6.7.5.1.4 Etiquetado de Yna1 con el epítipo HA

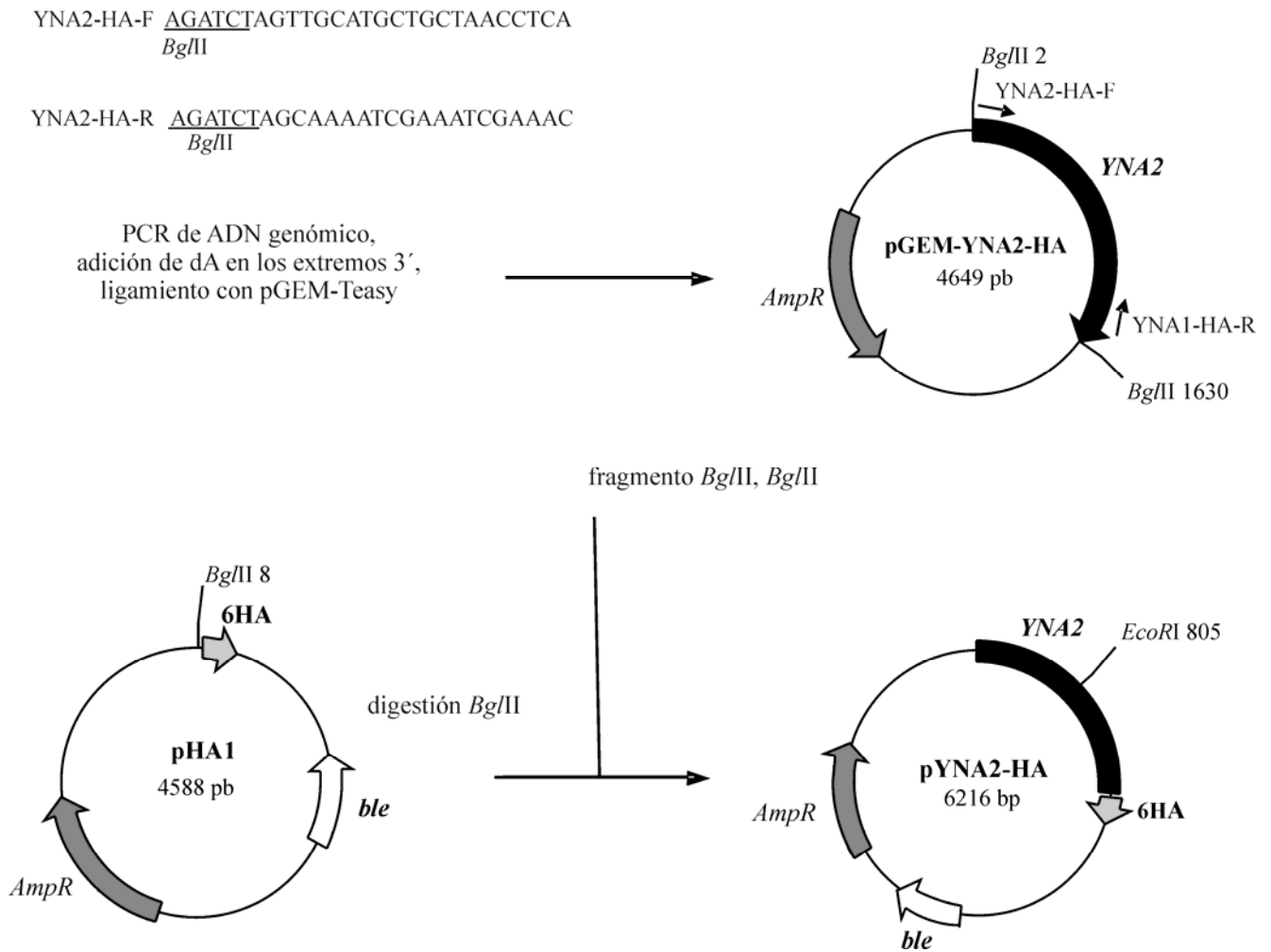
Para el etiquetado de Yna1 con el epítipo HA se construyó el plásmido pYNA1-HA. En primer lugar se clonó en pGEM-T easy un fragmento de 1398 pb de *YNA1* que contenía parte de la región codificante del gen sin codón de parada amplificado de DNA genómico usando los oligos YNA1-HA-F e YNA1-HA-R. Ambos oligos incorporaban una diana de restricción para *Bgl*III. Posteriormente, se linealizó el plásmido pHA1 con la enzima *Bgl*III y se obtuvo a partir de pGEM-YNA1HA el fragmento *Bgl*III-*Bgl*III que incluye la secuencia de *YNA1* insertada anteriormente. El clonaje de la secuencia así como su correcta orientación se comprobó mediante patrón de restricción y PCR con los oligos YNA1-HA-F, utilizado para el clonaje en pGEM-T easy, y tagR, que hibrida en el epítipo HA. El resultado es el plásmido pHA-YNA1 en el cual se encuentra parte de la pauta abierta de lectura de *YNA1* clonada en fase a la secuencia de 6HA en su extremo 3'. Su integración en el genoma de la levadura se dirigió hacia el *locus* del gen *YNA1* mediante digestión del plásmido con la enzima *Age*I que corta específicamente en *YNA1*. El etiquetado se comprobó mediante western-blot usando un anticuerpo comercial anti-HA (Roche).



**Figura 10. Construcción del plásmido pYNA1-HA.** Este plásmido contiene un fragmento de 1387 pb de la ORF del gen *YNA1* (en negro) clonado en fase al epítipo 6HA (en gris). El vector contiene además el casete marcador de resistencia a zeocina (*ble*) y de resistencia a ampicilina.

#### 6.7.5.1.5 Etiquetado de Yna2 con el epítipo HA

Para el etiquetado de Yna2 con el epítipo HA se construyó el plásmido pYNA2-HA. En primer lugar se clonó en pGEM-T easy un fragmento de 1633 pb de *YNA2* que contenía parte de la región codificante del gen sin codón de parada amplificado de DNA genómico usando los oligos YNA2-HA-F e YNA2-HA-R. Ambos oligos incorporaban una diana de restricción para *Bgl*III. Posteriormente, se linealizó el plásmido pHA1 con la enzima *Bgl*III y se obtuvo a partir de pGEM-YNA2HA el fragmento *Bgl*III-*Bgl*III que incluye la secuencia de *YNA2* insertada anteriormente. El clonaje de la secuencia así como su correcta orientación se comprobó mediante patrón de restricción y PCR con los oligos YNA2-HA-F, utilizado para el clonaje en pGEM-T easy, y tagR, que hibrida en el epítipo HA. El resultado es el plásmido pYNA2-HA en el cual se encuentra parte de la pauta abierta de lectura de *YNA2* clonada en fase a la secuencia de 6HA en su extremo 3'. Su integración en el genoma de la levadura se dirigió hacia el *locus* del gen *YNA2* mediante digestión del plásmido con la enzima *Eco*RI que corta específicamente en *YNA2*. El etiquetado se comprobó mediante western-blot usando un anticuerpo comercial anti-HA (Roche)



**Figura 11. Construcción del plásmido pYNA2-HA.** Este plásmido contiene un fragmento de 1623 pb de la ORF del gen *YNA2* (en negro) clonado en fase al epítipo 6HA (en gris). El vector contiene además el casete marcador de resistencia a zeocina (*ble*) y de resistencia a ampicilina.

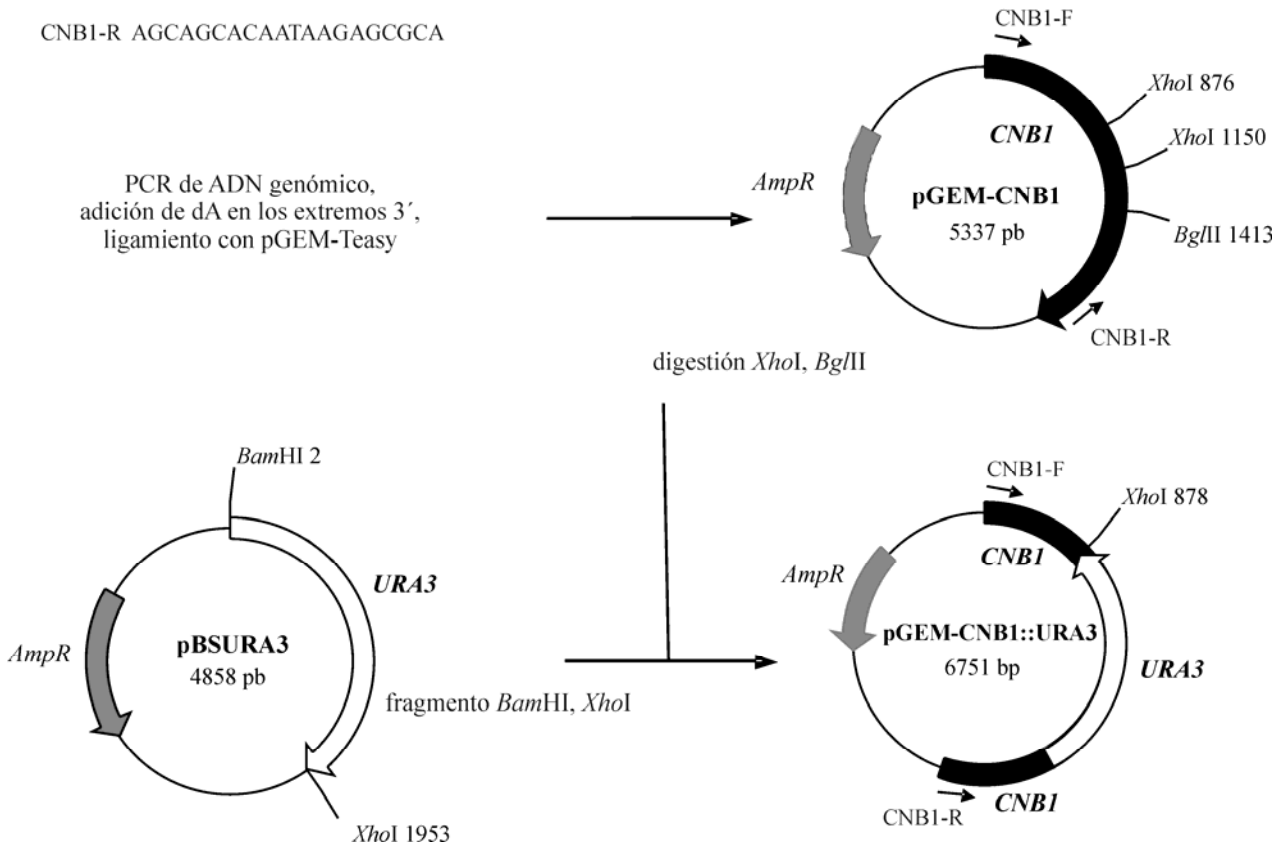
### 6.7.5.2 Elaboración de las cepas de levadura utilizadas en este trabajo

#### 6.7.5.2.1 Construcción de la cepa $\Delta cnb1::URA3 leu2::p18B1(LEU2)$

La interrupción por reemplazamiento del gen *CNB1* se realizó mediante un fragmento de DNA que contiene al gen *URA3* de *H. polymorpha* flanqueado por secuencias no contiguas del gen *CNB1* de 876 y 909 pb. Para obtener dicho fragmento se amplificó mediante PCR usando como molde DNA genómico un fragmento de 2322 pb (consistente en la secuencia comprendida entre los nucleótidos -986 y 1336 respecto al codón de iniciación del gen *CNB1*) con los oligos CNB1-F y CNB1-R. Este fragmento se clonó en pGEM-T easy obteniéndose el plásmido pGEM-CNB1. Finalmente para construir el plásmido pGEM-CNB1::URA3 que incorpora el gen marcador *URA3* se eliminó el fragmento *XhoI-BglIII* de *CNB1* de 537 pb (de -110 a +427) y se introdujo en estos sitios un fragmento *XhoI-BamHI* de 1952 pb procedente del plásmido pBSURA3, conteniendo el gen *URA3*. La cepa  $\Delta cnb1::URA3 leu2$  se obtuvo transformando la cepa WT *ura3 leu2* con el fragmento de 3,7 pb amplificado con los oligos CNB1-F y CNB1-R usando como molde el plásmido pGEM-CNB1::URA3. La interrupción génica se comprobó mediante PCR con los oligos CNB1-interrup-F and URA3-extII-F que hibridan fuera de la secuencia génica reemplazada y dentro del gen marcador, respectivamente. Finalmente la cepa  $\Delta cnb1::URA3 leu2::p18B1(LEU2)$  se elaboró mediante integración dirigida del plásmido p18B1 digerido con *BstEII* al locus *leu2* de la cepa  $\Delta cnb1::URA3 leu2$ .

CNB1-F AGATCGTGTCCGACCTGTTT

CNB1-R AGCAGCACATAAGAGCGCA

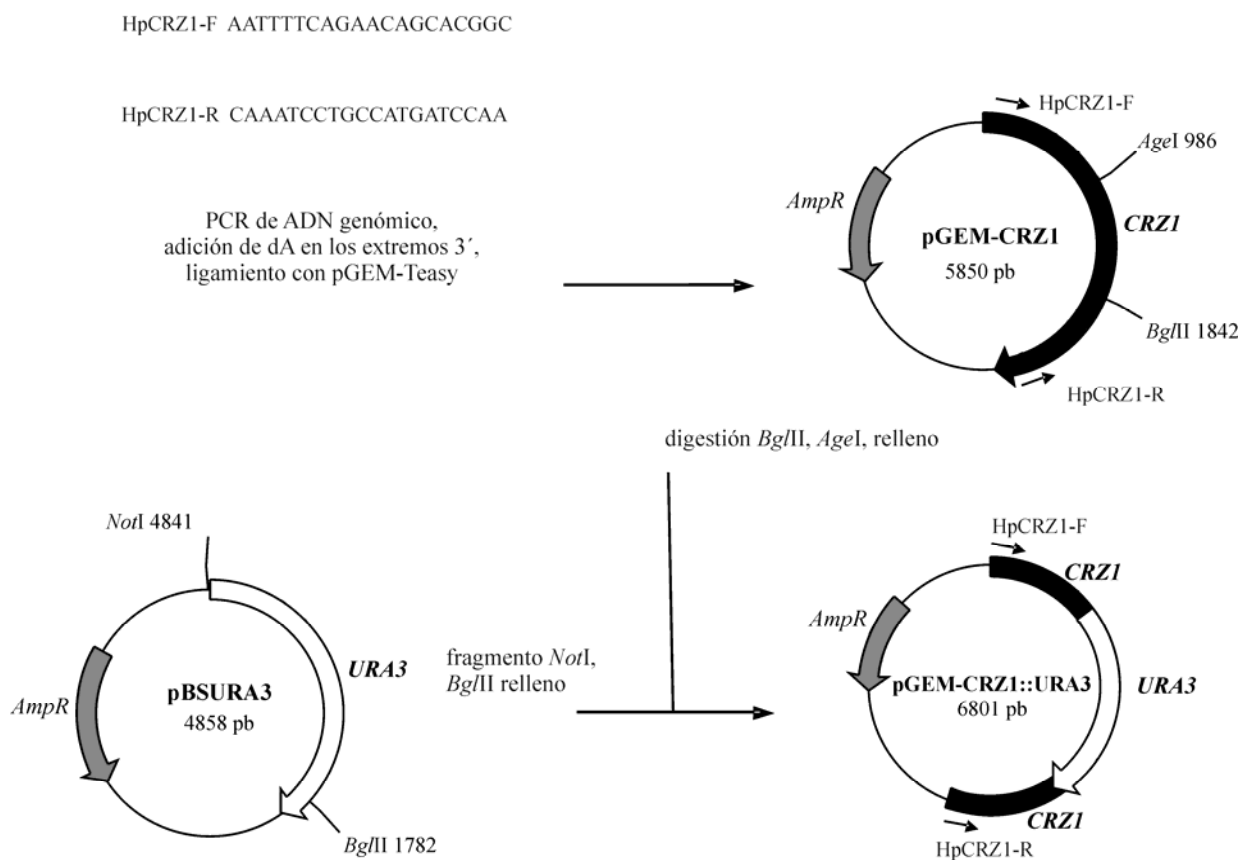


**Figura 12. Construcción del plásmido pGEM-CNBI::URA3.** El fragmento *HpCNB1* insertado en pGEM-T easy se sometió a digestión con las endonucleasas *XhoI* y *BglII*, delecionándose gran parte de la ORF. En su lugar se introdujo el marcador *URA3* obtenido mediante digestión con las endonucleasas *XhoI* y *BamHI* del plásmido pBSURA3.

#### 6.7.5.2.2 Construcción de la cepa $\Delta crz1::URA3 LEU2$

La interrupción por reemplazamiento del gen *CRZ1* se realizó mediante un fragmento de DNA que contiene al gen *LEU2* de *H. polymorpha* flaqueado por secuencias no contiguas del gen *CRZ1* de 984 y 995 pb. Para obtener dicho fragmento se amplificó mediante PCR usando como molde DNA genómico un fragmento de 2835 pb (consistente en la secuencia comprendida entre los nucleótidos -625 y 2210 respecto al codón de iniciación del gen *CRZ1*) con los oligos CRZ1-F y CRZ1-R. Este fragmento se clonó en pGEM-T easy obteniéndose el plásmido pGEM-CRZ1. Finalmente para

construir el plásmido pGEM-CRZ1::URA3 que incorpora el gen marcador *URA3* se eliminó el fragmento *AgeI-BglII* de *CRZ1* de 856 pb ( de +359 a +1215) y se introdujo en estos sitios un fragmento *NotI- BglIII* de 1799 pb procedente del plásmido pBSURA3, conteniendo el gen *URA3*. La cepa  $\Delta crz1::URA3 LEU2$  se obtuvo transformando la cepa WT *ura3 LEU2* con el fragmento de 3,7 pb amplificado con los oligos HpCRZ1-F y HpCRZ1-R usando como molde el plásmido pGEM-CRZ1::URA3. La interrupción génica se comprobó mediante PCR con los oligos HpCRZ1-interr-F and URA3ext-R que hibridan fuera de la secuencia génica reemplazada y dentro del gen marcador, respectivamente.

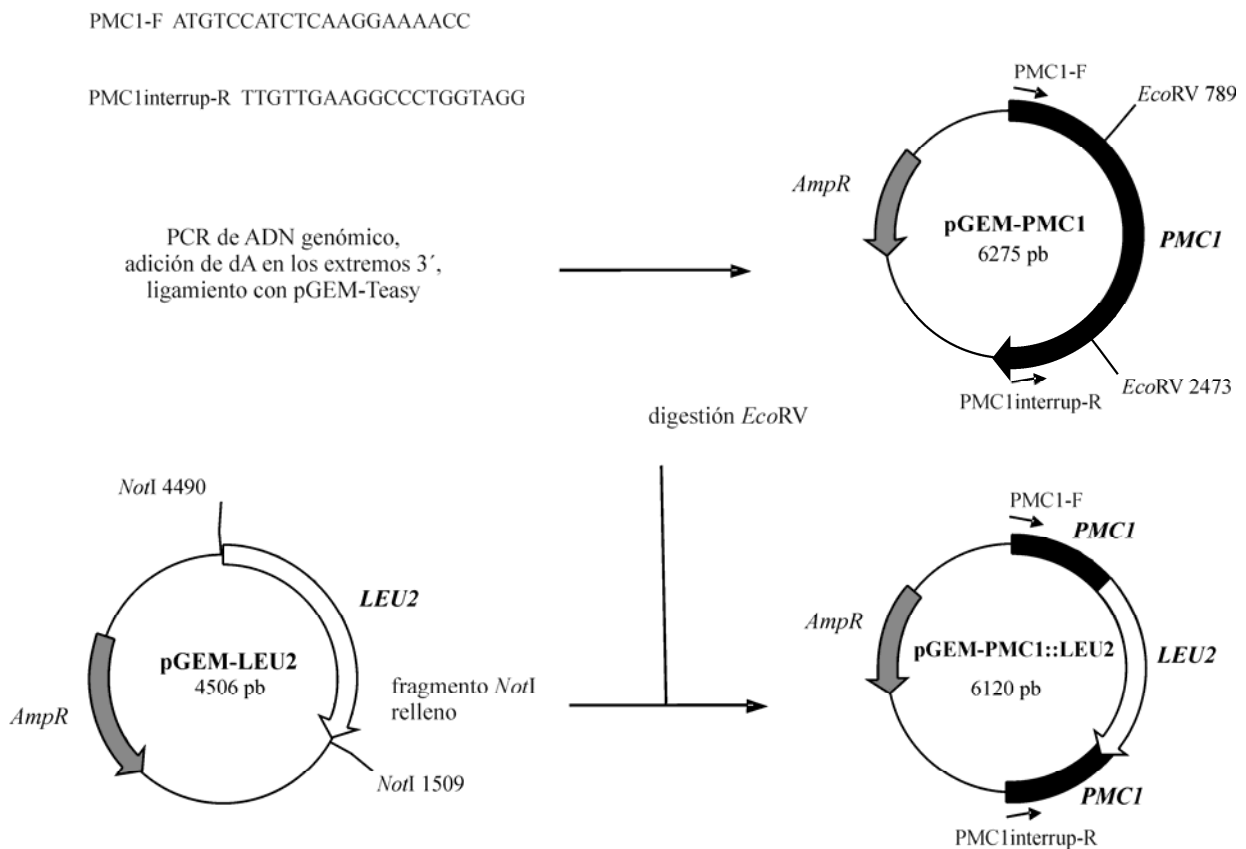


**Figura 13. Construcción del plásmido pGEM-CRZ1::URA3.** El fragmento *HpCRZ1* insertado en pGEM-T easy se sometió a digestión con la endonucleasas *AgeI* y *BglII*, delecionándose gran parte de la ORF. En su lugar se introdujo el marcador *URA3* obtenido mediante digestión con las endonucleasas *NotI* y *BglIII* del plásmido pBSURA3.



### 6.7.5.2.3 Construcción de la cepa $\Delta pmc1::LEU2 URA3$

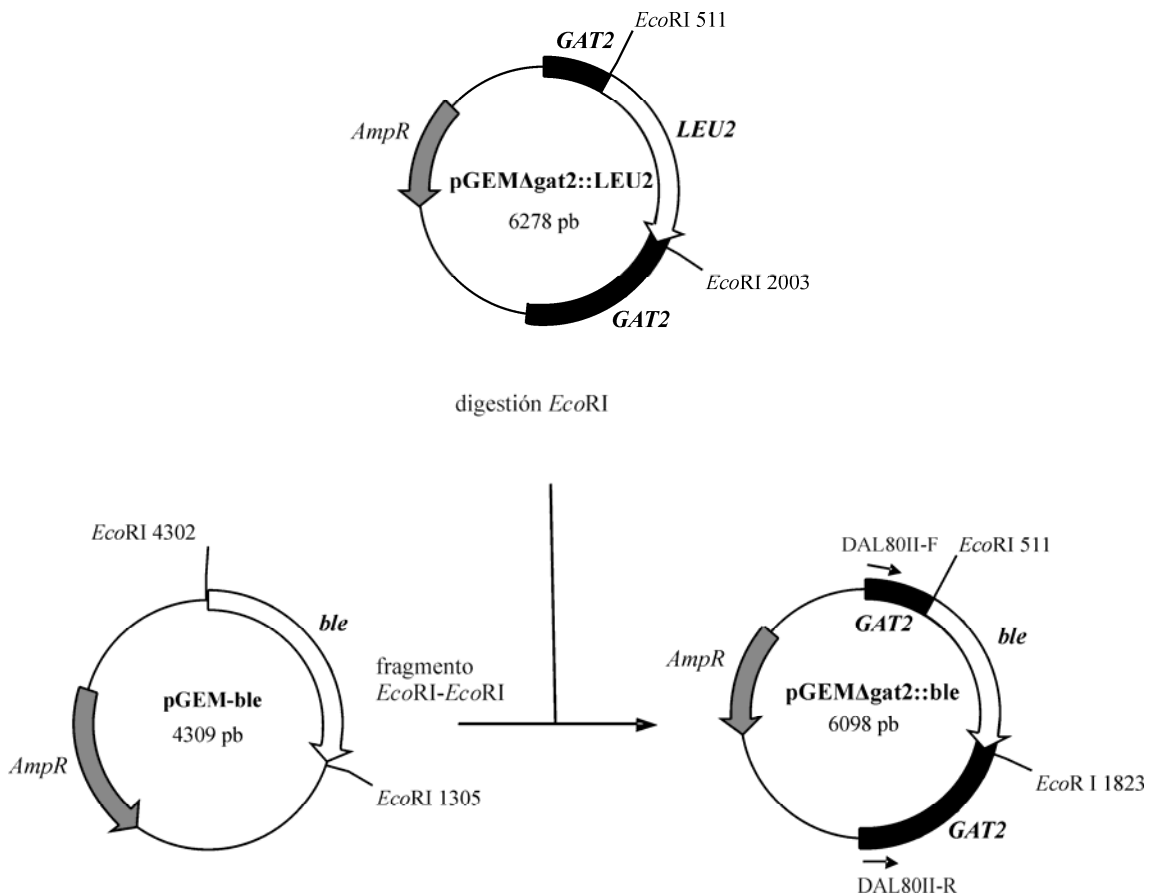
La interrupción por reemplazamiento del gen *PMC1* se realizó mediante un fragmento de DNA que contiene al gen *LEU2* de *H. polymorpha* flaqueado por secuencias no contiguas del gen *PMC1* de 788 pb. Para obtener dicho fragmento se amplificó mediante PCR usando como molde DNA genómico un fragmento de 3260 pb (consistente en la secuencia comprendida entre los nucleótidos +1 y 3260 respecto al codón de iniciación del gen *PMC1*, en este caso, la ORF completa) con los oligos PMC1-F and PMC1-interr-R. Este fragmento se clonó en pGEM-T easy obteniéndose el plásmido pGEM-PMC1. Finalmente para construir el plásmido pGEM-PMC1::LEU2 que incorpora el gen marcador *LEU2* se eliminó el fragmento *EcoRV-EcoRV* de *PMC1* de 1684 pb (de +788 a +2472) y se introdujo en estos sitios un fragmento *NotI-NotI* de 1525 pb procedente del plásmido pGEM-LEU2, conteniendo el gen *LEU2*. La cepa  $\Delta pmc1::LEU2 URA3$  se obtuvo transformando la cepa WT *URA3 leu2* con el fragmento de 3,06 pb amplificado con los oligos PMC1-F y PMC1-interr-R usando como molde el plásmido pGEM-PMC1::LEU2. La interrupción génica se comprobó mediante PCR con los oligos PMC1ext-R y URE2 interr-F que hibridan fuera de la secuencia génica reemplazada y dentro del gen marcador, respectivamente.



**Figura 14. Construcción del plásmido pGEM-PMC1::LEU2.** El fragmento *HpPMCI* insertado en pGEM-T easy se sometió a digestión con la endonucleasa *EcoRV*, deleccionándose gran parte de la ORF. En su lugar se introdujo el marcador *LEU2* obtenido mediante digestión con la endonucleasa *NotI* del plásmido pGEM-LEU2.

### 6.7.5.2.3 Construcción de la cepa $\Delta ure2::leu2::URA3 PMR1-lacZ(LEU2) \Delta gat2::ble$

Con el fin de disponer de una cepa donde los genes *URE2* y *GAT2* estuvieran deletados que además permitiera el estudio de la expresión del gen *PMR1* transformamos la cepa  $\Delta ure2::leu2::URA3 PMR1-lacZ(LEU2)$  con un fragmento que contiene el gen de resistencia a zeocina (*ble*) flanqueado por secuencias no contiguas del gen *GAT2*. Este fragmento se amplificó por PCR con los oligos DAL80II-F y DAL80II-R usando como molde el plásmido pGEM $\Delta gat2::ble$ . Para construir este plásmido se eliminó el fragmento *EcoRI-EcoRI* conteniendo el gen marcador *LEU2* del plásmido pGEM $\Delta gat2::LEU2$  (Medina, 2009) y se insertó en su lugar el fragmento *EcoRI-EcoRI* conteniendo el gen *ble* procedente del plásmido pGEM-*ble*.



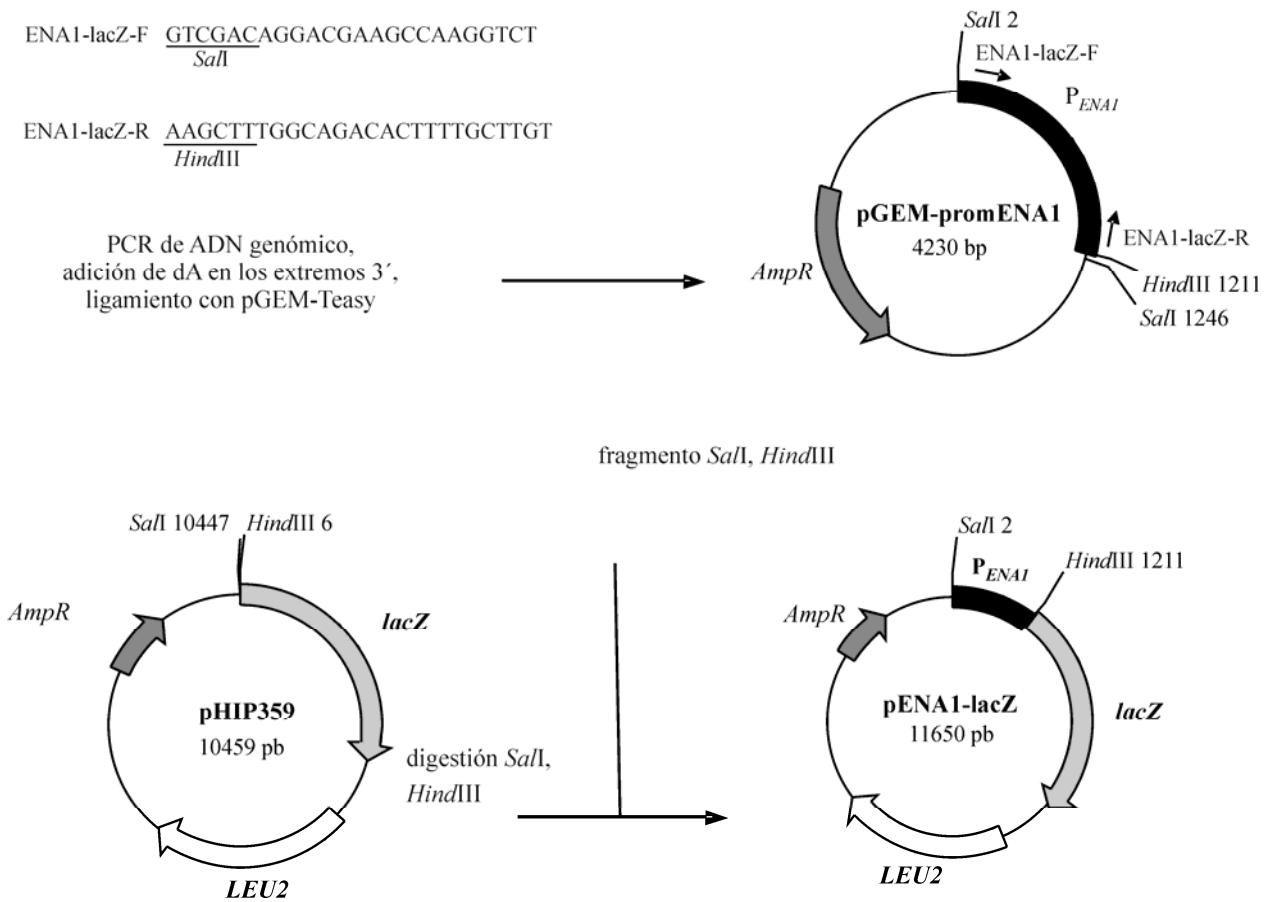
**Figura 15. Construcción del plásmido pGAT2::ble.** El plásmido pGEM $\Delta gat2::LEU2$  se sometió a digestión con la endonucleasa *EcoRI*, deletionándose el gen marcador *LEU2*. En su lugar se introdujo el casete de resistencia a zeocina (*ble*) obtenido mediante digestión con la endonucleasa *EcoRI* del plásmido pGEM-*ble*.

### 6.7.5.3 Construcción de plásmidos con fusiones a *lacZ*

Con el objetivo de analizar la expresión de ciertos genes en diferentes cepas se construyeron una serie de plásmidos que portan la región 5' no codificante de los genes de interés más 39 pb de la región codificante fusionada en fase al gen *lacZ*. Esta construcción permite utilizar la actividad  $\beta$ -galactosidasa como medida de la inducción de los genes en las distintas cepas.

#### 6.7.5.3.1 Construcción del plásmido pENA1-lacZ

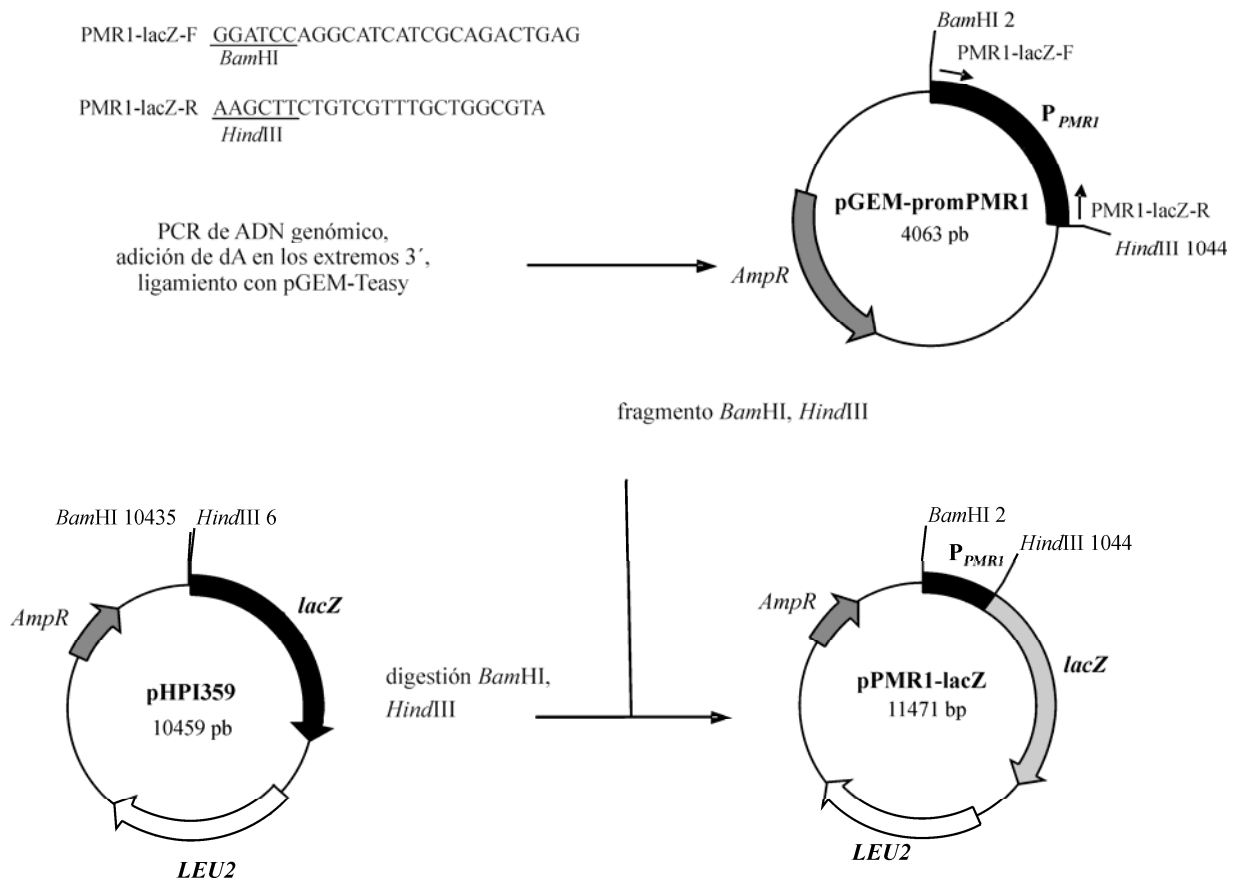
La secuencia comprendida entre los nucleótidos -1164 y +39 respecto al codón de iniciación del gen *ENA1* se amplificó por PCR con Pfu usando como molde DNA genómico con los oligos ENA1-lacZ-F y ENA1-lacZ-R que incorporan las dianas de restricción *SalI* y *HindIII*, respectivamente. El fragmento amplificado se clonó en pGEM-T easy para obtener el plásmido pGEM-promENA1. Finalmente para construir el plásmido pENA1-lacZ el fragmento *SalI-HindIII* conteniendo el promotor de *ENA1* procedente de pGEM-promENA1 se insertó en los sitios *BamHI* y *HindIII* del plásmido pHIP359 (Brito *et al.*, 1999).



**Figura 16.** Construcción del plásmido pENA1-lacZ. El plásmido contiene 1164 pb de la región 5' no codificante y 39 pb de la región codificante del gen *ENA1* clonado en fase al gen *lacZ*. El vector contiene el gen marcador *LEU2*.

#### 6.7.5.3.2 Construcción del plásmido pPMR1-lacZ

La secuencia comprendida entre los nucleótidos -1009 y +39 respecto al codón de iniciación del gen *PMR1* se amplificó por PCR con Pfu usando como molde DNA genómico con los oligos PMR1-lacZ-F y PMR1-lacZ-R que incorporan las dianas de restricción *BamHI* y *HindIII*, respectivamente. El fragmento amplificado se clonó en pGEM-T easy para obtener el plásmido pGEM-promPMR1. Finalmente para construir el plásmido pPMR1-lacZ el fragmento *BamHI-HindIII* conteniendo el promotor de *PMR1* procedente de pGEM-promPMR1 se insertó en los sitios *BamHI* y *HindIII* del plásmido pHIP359 (Brito *et al.*, 1999).



**Figura 17. Construcción del plásmido pPMR1-lacZ.** El plásmido contiene 1009 pb de la región 5' no codificante y 39 pb de la región codificante del gen *PMR1* clonado en fase al gen *lacZ*. El vector contiene el gen marcador *LEU2*.

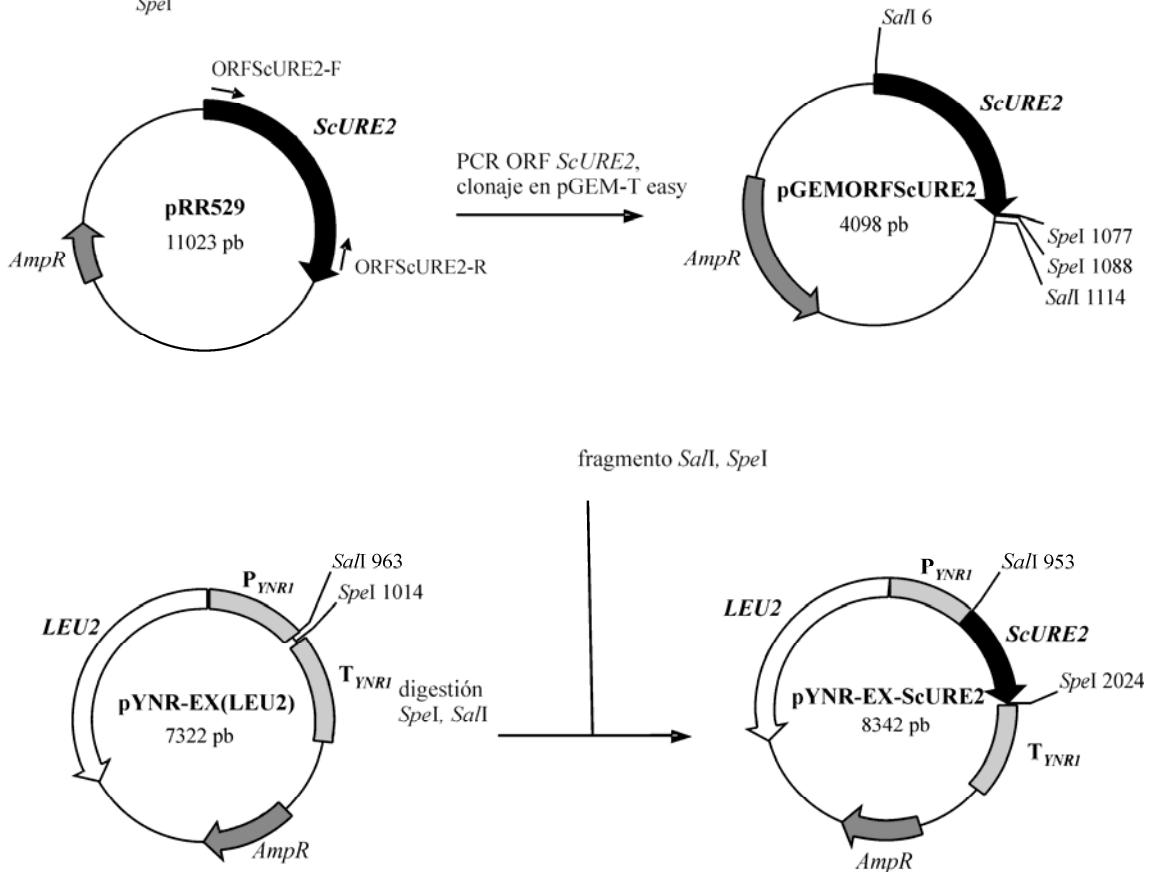
### 6.7.5.3.3 Construcción del plásmido pYNR1-EX-ScURE2

El vector de expresión pYNR-EX fue construido clonando en pBluescript la secuencia promotora del gen *YNR1* (Perdomo *et al.*, 2002) La expresión de proteínas desde este vector depende de la fuente de nitrógeno presente en el medio: la expresión se induce un medio con nitrato, y es reprimida por fuentes de nitrógeno reducido como el amonio o la glutamina. El vector pYNR-EX (*LEU2*) consta de dos secuencias de aproximadamente 1 Kpb procedentes de las regiones 5' y 3' no codificantes del gen *YNR1*, además del gen marcador *LEU2*. Este plásmido se uso en este trabajo para clonar el gen *ScURE2* con el fin de conseguir su expresión en *H. polymorpha*.

En primer lugar la ORF completa del gen *ScURE2* se amplificó por PCR con Pfu usando como molde el plásmido pRR529 (Baxa *et al.*, 2003) con los oligos ORFScURE2-F y ORFScURE2-R que incorporan las dianas de restricción *Sall* y *SpeI*, respectivamente. El fragmento amplificado se clonó en pGEM-T easy para obtener el plásmido pGEMORFScURE2. Finalmente para construir el plásmido pYNR-EX-ScURE2 el fragmento *Sall*-*SpeI* conteniendo la ORF del gen *ScURE2* procedente de pGEMORFScURE2 se insertó en los sitios *Sall* y *SpeI* del plásmido pYNR-EX.

ORFScURE2-F ACGCGTTCGACATGATGAATAACAACGGCAAC  
*Sall*

ORFScURE2-R GGACTAGTTCATTACACCACGCAATGCCT  
*SpeI*



**Figura 18. Construcción del plásmido pYNR-EX ScURE2.** El plásmido contiene la ORF del gen *ScURE2* bajo el promotor del gen *YNRI*.

#### 6.7.5.3.4 Construcción de la cepa *nPMR1*.

Con el fin de obtener una cepa con múltiples copias del gen *PMR1* se construyó el plásmido pGEMexpPMR1-LEU2. En primer lugar se amplificó mediante PCR usando como molde DNA genómico un fragmento de 3966 pb con los oligos nPMR1-F y nPMR1-R. Este fragmento se clonó en pGEM-T easy para obtener el plásmido pGEMexpPMR1 que se linealizó con la enzima *NdeI* y se rellenó con la klenow. Finalmente se insertó en ese sitio el fragmento como *StuI-StuI* conteniendo el gen marcador *LEU2* procedente del plásmido pGEMLEU2(*StuI*). La cepa *nPMR1 LEU2 URA3* se obtuvo transformando la cepa WT *leu2 URA3* con el plásmido pGEMexpPMR1-LEU2 linealizado en el gen *LEU2* con la enzima *BstEII*.

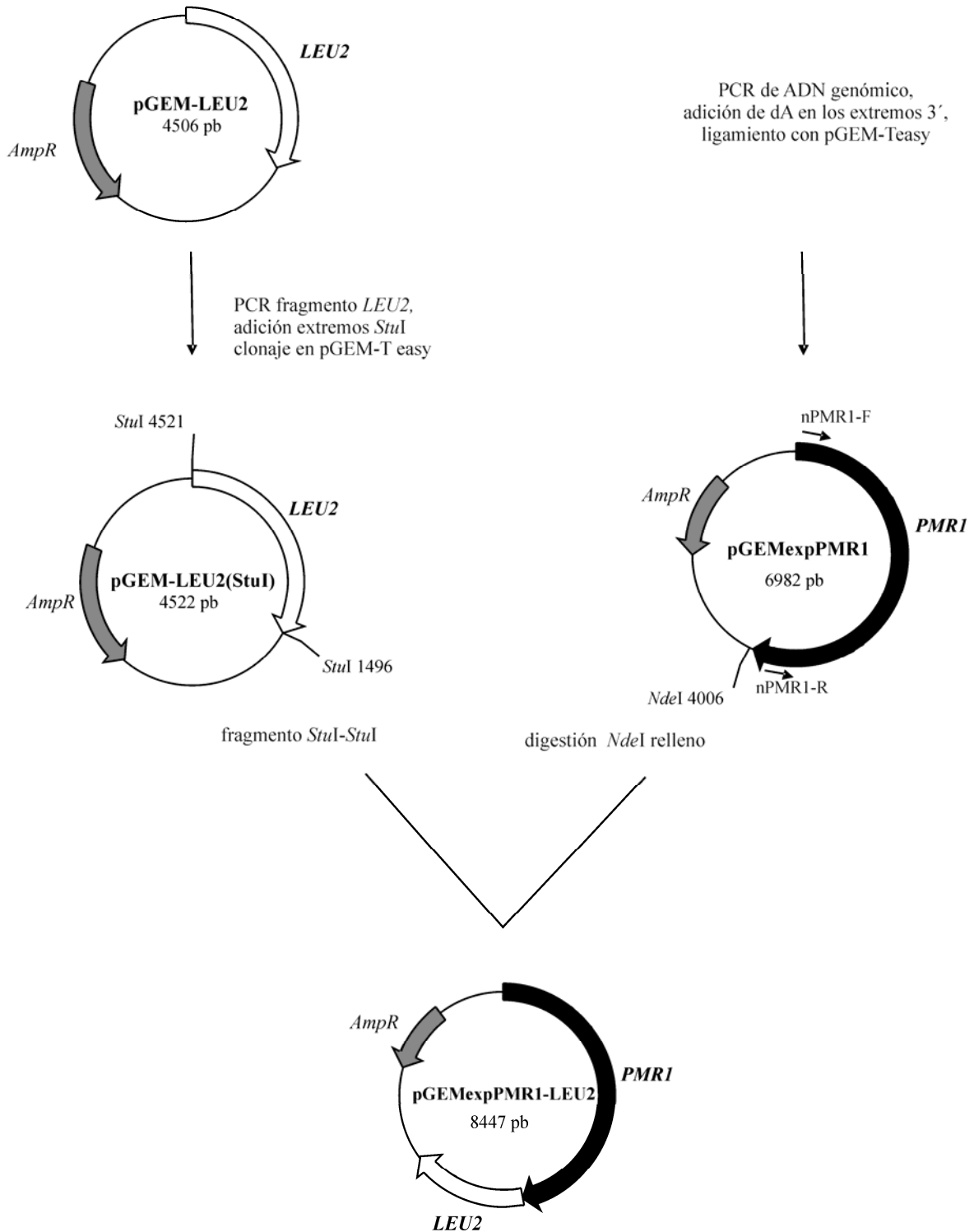


LEU2-StuI-F GAAGGCCTATGAATTCTGAGTCCCTGAGTA  
*StuI*

nPMR1-F CCGCGGAAACGATACGAGCAGCTGG

LEU2-StuI-R GAAGGCCTTAGGATCCGTGCAATGGCTG  
*StuI*

nPMR1-R GCGGCCGCAAGAAGTTGGCTGCCAAGG



**Figura 19. Construcción del plásmido pGEMexpPMR1-LEU2.** El plásmido contiene la ORF completa del gen *PMR1* más 705 y 513 pb de las regiones 5' y 3' no codificantes, respectivamente. El vector contiene además el gen marcador *LEU2*.

#### 6.7.5.4 Otros plásmidos utilizados en este trabajo

**pAMS367:** Este plásmido contiene 4 copias en tándem de la secuencia CACCAGTCGGTGGCTGTGCGCTTG definida como el elemento de respuesta dependiente de calcineurina (*calcineurin-dependent response element*: CDRE) (4CDRE) clonadas en fase al gen reportero *lacZ* (Stathopoulos y Cyert, 1997). El plásmido fue creado mediante la inserción del fragmento *Bam*HI- *Bg*III procedente del plásmido pAMS341 que contiene el tetrámero en el sitio *Bg*III del plásmido pJL638. El plásmido pAMS341 deriva de la inserción iterativa del elemento flanqueado por las dianas *Bam*HI y *Bg*III en los sitios *Bam*HI y *Bg*III de LITMUS 28 (NEB). El plásmido contiene el gen marcador *ScURA3*.

**pAMS367-LEU2:** Este plásmido deriva del plásmido pAMS367 que se modificó en el sitio *Stu*I presente en el gen marcador *ScURA3* mediante la inserción en dicho sitio del gen marcador de *H. polymorpha* *LEU2*.

**PT8:** Este plásmido contiene el gen marcador *LEU2* interrumpido por el gen marcador *URA3*. La transformación de una cepa de *H. polymorpha* *LEU2*, *ura3* con el fragmento *Xho*I-*Xho*I permite el cambio de marcadores perdiéndose la auxotrofia para el uracilo y recuperándose para la leucina.

# *Apéndices*

---

**APÉNDICE I. Cepas de *H. polymorpha* utilizadas en este trabajo**

Cepa	Genotipo	Origen
WT*	NCYC495 <i>leu2::p18B1(LEU2) ura3::pBSURA3(URA3)</i>	GMN
PT1401	$\Delta ure2::LEU2 ura3::pBSURA3(URA3)$	GMN
BM1600	$\Delta ure2::LEU2 ura3::pGEM-URE2-URA3$	GMN
BM1700	NCYC495 <i>leu2::p18B1(LEU2) ura3::pGEM-URE2-URA3</i>	GMN
BM2502	$\Delta gat2::LEU2 ura3::pBSURA3(URA3)$	GMN
RMG55	$\Delta tep1:: LEU2 URA3$	GMN
CR2503	NCYC495 <i>leu2::p18B1(LEU2) ura3::pGEM-GAT2-URA3</i>	Este trabajo
CR3001	$\Delta cnb1::URA3 leu2::p18B1(LEU2)$	Este trabajo
CR3002	$\Delta ure2::LEU2 \Delta cnb1::URA3$	Este trabajo
CR3004	$\Delta crz1::URA3 leu2::p18B1(LEU2)$	Este trabajo
CR4001	NCYC495 <i>leu2::P<sub>ENAI</sub>-lacZ-LEU2 ura3::pBSURA3(URA3)</i>	Este trabajo
CR4002	$\Delta ure2::leu2::URA3 P_{ENAI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR4003	$\Delta cnb1::URA3 leu2:: P_{ENAI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR4004	$\Delta gat1::URA3 leu2:: P_{ENAI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR4005	$\Delta crz1::URA3 leu2:: P_{ENAI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR 4006	$\Delta tep1:: leu2::URA3 P_{ENAI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR5001	NCYC495 <i>leu2::P<sub>PMRI</sub>-lacZ-LEU2 ura3::pBSURA3(URA3)</i>	Este trabajo
CR5002	$\Delta ure2::leu2::URA3 P_{PMRI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR5003	$\Delta gat2::leu2::URA3 P_{PMRI}-lacZ-LEU2$	Este trabajo
CR5004	$\Delta ure2::leu2::URA3 P_{PMRI}-lacZ-LEU2 \Delta gat2::ble$	Este trabajo
CR5005	NCYC495 <i>leu2::P<sub>PMRI</sub>-lacZ-LEU2 ura3::pGEM-GAT2-URA3</i>	Este trabajo
YM6001	NCYC495 <i>GAT1-6HA (ble) leu2::p18B1(LEU2) ura3::pBSURA3(URA3)</i>	GMN

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Origen</b>
CR6002	$\Delta ure2::leu2::URA3$ GAT1-6HA (ble)	Este trabajo
CR6003	$\Delta cnb1::URA3$ GAT1-6HA (ble) leu2	Este trabajo
CR6004	NCYC495 GAT2-6HA (ble) ura3::pBSURA3(URA3)leu2	Este trabajo
CR6005	$\Delta ure2::leu2::URA3$ GAT2-6HA (ble)	Este trabajo
CR6006	$\Delta cnb1::URA3$ GAT2-6HA (ble) leu2	Este trabajo
CR6007	$\Delta crz1::URA3$ GAT1-6HA (ble) leu2	Este trabajo
CR6008	$\Delta tep1::URA3$ GAT1-6HA (ble) leu2	GMN
CR6011	NCYC495 YNA2-6HA (ble) ura3::pBSURA3(URA3) leu2	Este trabajo
CR6012	$\Delta gat2::URA3$ YNA2-6HA (ble) leu2	Este trabajo
CR7001	NCYC495 URE2-6HA(ble) leu2::p18B1(LEU2) ura3::pBSURA3(URA3)	Este trabajo
CR7002	$\Delta cnb1::URA3$ URE2-6HA(ble) leu2	Este trabajo
CR8001	NCYC495 ura3::pBSURA3(URA3) leu2:: pAMS367(4xCDRE-lacZ)-LEU2	Este trabajo
CR8002	$\Delta ure2::leu2::URA3$ pAMS367(4xCDRE-lacZ)-LEU2	Este trabajo
CR8003	$\Delta gat2::leu2::URA3$ pAMS367(4xCDRE-lacZ)-LEU2	Este trabajo
CR8004	NCYC495 ura3::pGEM-GAT2-URA3 leu2:: pAMS367(4xCDRE-lacZ)-LEU2	Este trabajo
CR8005	$\Delta ure2::leu2::URA3$ leu2:: pAMS367(4xCDRE-lacZ)-LEU2 $\Delta gat2::ble$	Este trabajo
CR8006	$\Delta tep1::URA3$ leu2:: pAMS367(4xCDRE-lacZ)-LEU2	Este trabajo
CR9001	$\Delta pmc1::LEU2$ ura3::pBSURA3(URA3)	Este trabajo
CR9002	$\Delta ure2::leu2::URA3$ $\Delta pmc1::LEU2$	Este trabajo
CR9003	$\Delta cnb1::URA3$ $\Delta pmc1::LEU2$	Este trabajo
CR9004	NCYC495 leu2::pGEM-PMR1-LEU2 ura3::pBSURA3(URA3)	Este trabajo
CR10001	$\Delta ure2::leu2::URA3$ pYNR-EX-ScURE2 (LEU2)	Este trabajo

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Origen</b>
YNRgal	NCYC495 <i>leu2:: P<sub>YNRI</sub>-lacZ-LEU2</i>	GMN
FN1203	$\Delta$ <i>ynr1::URA3 leu2:: P<sub>YNRI</sub>-lacZ-LEU2</i>	GMN
FN3203	$\Delta$ <i>ynt1::ura3</i> $\Delta$ <i>ynr1::URA3 leu2:: P<sub>YNRI</sub>-lacZ-LEU2</i>	GMN
Tep1 <sup>G127E</sup>	<i>tep1<sup>G127E</sup> LEU2 URA3</i>	GMN

**APÉNDICE II. Cebadores utilizados en este trabajo**

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Aplicación
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC	Amplificación de insertos en los vectores pGEM-T
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Amplificación de insertos en los vectores pGEM-T
<u>CNB1-F</u>	AGA TCG TGT CGG ACC TGT TT	Aislamiento e interrupción de <i>HpCNB1</i>
<u>CNB1-R</u>	AGC AGC ACA ATA AGA GCG CA	Aislamiento e interrupción de <i>HpCNB1</i>
<u>CNB1-interrup-F</u>	TCC AAA TTC CCG TCC AAA	Comprobación de la interrupción de <i>HpCNB1</i>
<u>HpCRZ1-F</u>	AAT TTT CAG AAC AGC ACG GC	Aislamiento e interrupción de <i>HpCRZ1</i>
<u>HpCRZ1-F</u>	CAA ATC CTG CCA TGA TCC AA	Aislamiento e interrupción de <i>HpCRZ1</i>
<u>HpCRZ1-ext-F</u>	CAA ATC CCA GAT GGC TTT CA	Comprobación de la interrupción de <i>HpCRZ1</i>
<u>PMC1-F</u>	ATG TCC ATC TCA AGG AAA ACC	Aislamiento e interrupción de <i>HpPMC1</i>
<u>PMC1-interrup-R</u>	TTG TTG AAG GCC CTG GTA GG	Aislamiento e interrupción de <i>HpPMC1</i>
<u>PMC1ext-R</u>	GGG GTC CGA CTT CTT CTT TCT	Comprobación de la interrupción de <i>HpCRZ1</i>
<u>URE2 interr-F</u>	AGC TCC AGC CAT TGC ACG	Comprobación interrupción de genes con <i>LEU2</i>
DAL80II-F	AAT AAT TGG CCA TCC GCA CA	Interrupción de <i>HpGAT2</i>
DAL80II-R	TAT CCA CAG GCT ATG TCT CGG	Interrupción de <i>HpGAT2</i>

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Aplicación
<u>URA3extII-F</u>	TGG ATA TTG GAT TGC AAG CAG	Comprobación interrupción de genes con <i>URA3</i>
<u>URA3ext-R</u>	CAT TGA AGC GCT TAG TAC AAC C	Comprobación interrupción de genes con <i>URA3</i>
<u>tagR</u>	AGA GGT CGA CGT GAA TGA TCG TTC CAC TTT T	Comprobación del etiquetado de genes con el epítipo 6HA
<u>Ure2exp-F</u>	GGA TCC TGA ACA ATA CCA TCT CCA ACC	Fusión URE2-6HA
<u>Ure2-HAtag-R</u>	GGA TCC CTC ATT ACC TTT CAA TGC CC	Fusión URE2-6HA
<u>GAT1GFP-F</u>	CCC AAG CTT CGC AGA CCG T	Fusión GAT1-6HA
<u>GAT1GFP-R</u>	GAA GAT TCT CAG AGA CAT AGT CAG CCA A	Fusión GAT1-6HA
<u>GAT2-HA-F</u>	AAG CTT AGC TTC TGA AAA AGG AGA TTG	Fusión GAT2-6HA
<u>GAT2-HA-R</u>	AGA TCT AAC ATT GAA CTT GAG CCA	Fusión GAT2-6HA
<u>YNA1-HA-F</u>	AGA TCT CTT TCT CTC CAA AAA CGA CCC	Fusión YNA1-6HA
<u>YNA1-HA-R</u>	AGA TCT AAA TTT TGT CCA CCT GGA CG	Fusión YNA1-6HA
<u>YNA2-HA-F</u>	AGA TCT AGT TGC ATG CTG CTA ACC TCA	Fusión YNA2-6HA
<u>YNA2-HA-R</u>	AGA TCT AGC AAA ATC GAA ATC GAA AC	Fusión YNA2-HA
<u>C-URE2-F</u>	GCT GGT GTA CGG GTG TCT CT	Comprobación del etiquetado de <i>URE2</i> con el epítipo 6HA
<u>C-GAT1-F</u>	TCC TCC AAG ACA AAA AGC AT	Comprobación del etiquetado de <i>GAT1</i> con el epítipo 6HA



<u>RT-DAL80-F</u>	AAC CGA AAC GAA AGT TCA CG	Comprobación del etiquetado de <i>GAT2</i> con el epítipo 6HA
<u>ENA1-lacZ-F</u>	GTC GAC AGG ACG AAG CCA AGG TCT	Fusión ENA1-lacZ
<u>ENA1-lacZ-R</u>	AAG CTT TGG CAG ACA CTT TTG CTT GT	Fusión ENA1-lacZ
<u>PMR1-lacZ-F</u>	GGA TCC AGG CAT CAT CGC AGA CTG AG	Fusión PMR1-lacZ
<u>PMR1-lacZ-R</u>	AAG CTT CTG TCA GTT TGC TGG CGT A	Fusión PMR1-lacZ
<u>ura3f</u>	GGT GAA GCA TTA GGT CCC	Confirmación de la existencia de una única copia del gen <i>lacZ</i>
<u>ura3r</u>	GCA CAGTTA AGC CGC	Confirmación de la existencia de una única copia del gen <i>lacZ</i>
<u>nPMR1-F</u>	CCG CGG AAG ACA GAT ACG AGC AGC TGG	Sobreexpresión de <i>PMR1</i>
<u>nPMR1-R</u>	GCG GCC GCA AGA AGT TGG CTG CCA AGG	Sobreexpresión de <i>PMR1</i>
<u>LEU2-StuI-F</u>	GAA GGC CTA TGA ATT CTG AGT CCC TGA GTA	Aislamiento del gen <i>LEU2</i> con extremos romos
<u>LEU2-StuI-R</u>	GAA GGC CTT AGG ATC CGT GCA ATG GCT G	Aislamiento del gen <i>LEU2</i> con extremos romos
<u>ORFScURE2-F</u>	ACG CGT CGA CAT GAT GAA TAA CAA CGG CAA C	Expresión de <i>ScURE2</i> en <i>H. polymorpha</i>
<u>ORFScURE2-R</u>	GGA CTA GTT CAT TCA CCA CGC AAT GCC T	Expresión de <i>ScURE2</i> en <i>H. polymorpha</i>
<u>URE2expF</u>	GGA TCC TGA ACA ATA CCA TCT CCA ACC	Expresión de <i>HpURE2</i> en <i>E. coli</i>
<u>URE2expR</u>	AAG CTT CTA CTC ATT ACC TTT CAA TGC	Expresión de <i>HpURE2</i> en <i>E. coli</i>

**APÉNDICE II. Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>	<b>Aplicación</b>
<u>Q-ACT11-F</u>	GAG GTT ACA CGT TCT CCA CCA	Medida de la expresión del gen de referencia en las reacciones de PCR a tiempo real
<u>Q-ACT11-R</u>	ACC TGT CAA TCA GGC AAC TC	Medida de la expresión del gen de referencia en las reacciones de PCR a tiempo real
<u>Q-YNR1-F</u>	GGC ATC ACC CCA ACT TAC C	Medida de la expresión de <i>HpYNR1</i>
<u>Q-YNR1-R</u>	CTC ACT CCG CTC CAA TTC TC	Medida de la expresión de <i>HpYNR1</i>
<u>Q-URE2-F</u>	GGT CGA GAA AAA GCT CAA	Medida de la expresión de <i>HpURE2</i>
<u>Q-URE2-R</u>	CGC ACT TCG TCG GTG TAT C	Medida de la expresión de <i>HpURE2</i>
<u>Q-ENA1-F</u>	CCG ACA AAA CAG GCA CTT	Medida de la expresión de <i>HpENA1</i>
<u>Q-ENA1-R</u>	TCA CAC AGA AAT CCG CAA A	Medida de la expresión de <i>HpENA1</i>
<u>Q-GAT1-F</u>	AGA AGC CAC CAG GAG ACA GA	Medida de la expresión de <i>HpGAT1</i>
<u>Q-GAT1-R</u>	ATT AGT GGG CTC GGT TGT G	Medida de la expresión de <i>HpGAT1</i>
<u>RT-DAL80-F</u>	AAC CGA AAC GAA AGT TCA CG	Medida de la expresión de <i>HpGAT2</i>
<u>RT-DAL80-R</u>	TGC ATT GCT CAC TGA ACT CC	Medida de la expresión de <i>HpGAT2</i>

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>	<b>Aplicación</b>
<u>Q-YNA1-F</u>	TAC GCA GGA ACG AGG AAA AC	Medida de la expresión de <i>HpYNA1</i>
<u>Q-YNA1-R</u>	TGT AGC AAT ACC ACG CAA G	Medida de la expresión de <i>HpYNA1</i>
<u>Q-YNA2-F</u>	GCA GCA GGA GCA CAA CAT AG	Medida de la expresión de <i>HpYNA2</i>
<u>Q-YNA2-R</u>	TGA ACA GGG GTT TTC CAA TC	Medida de la expresión de <i>HpYNA2</i>
<u>Q-PMA1-F</u>	TGA GAA CCG ACC CAA AGG	Medida de la expresión de <i>HpPMA1</i>
<u>Q-PMA1-R</u>	CAA ACC ACA GAT AAC ACC GAA A	Medida de la expresión de <i>HpPMA1</i>
<u>Q-NHA1.1-F</u>	TTA CCT TGC GGT CAA CAT CA	Medida de la expresión de <i>HpNHA1</i>
<u>Q-NHA1.2-R</u>	ACG CCA GGA ACG ACT CTC TA	Medida de la expresión de <i>HpNHA1</i>

## APÉNDICE III. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Origen
pBluescript KS(+)	amp <sup>R</sup> , lacZ	Stratagene (E.E.U.U)
pBSURA3	Derivado de pBluescript. Porta un fragmento de 2 kpb que contiene el gen <i>URA3</i> , amp <sup>R</sup>	GMN
pGEM-T	amp <sup>R</sup> , lacZ	Promega (EE.UU)
pGEM-T easy	amp <sup>R</sup> , lacZ	Promega (EE.UU)
pGEMLEU2	Derivado de pGEM-T easy. Porta un fragmento de 1.5 kpb que contiene el gen <i>LEU2</i> . amp <sup>R</sup>	GMN
p18B1	Derivado de pTZ18R (Pharmacia). Porta un fragmento de 2.5 kpb que contiene el gen <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup>	(Agaphonov <i>et al.</i> , 1994)
pT8	Derivado de p18B1. Porta un fragmento de 3.6 kpb con el gen <i>LEU2</i> interrumpido con el gen <i>URA3</i> , amp <sup>R</sup>	GMN
pGEM-CNB1	Derivado de pGEM-T easy. Porta un fragmento de 2322 pb que contiene la ORF del gen <i>CNB1</i> más 986 y 904 pb correspondientes a las regiones 5' y 3' no	Este trabajo
pGEM-CNB1:: <i>URA3</i>	Derivado de pGEM-CNB1. Contiene el fragmento de 3736 pb usado para la interrupción de <i>CNB1</i> con el gen marcador <i>URA3</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEM-CRZ1	Derivado de pGEM-T easy. Porta un fragmento de 2835 pb que contiene la ORF de <i>CRZ1</i> más 626 y 409 pb correspondientes a las regiones 5' y 3' no codificantes	Este trabajo
pGEM-CRZ1:: <i>URA3</i>	Derivado de pGEM-CRZ1. Contiene un fragmento de 3786 pb usado para la interrupción de <i>CRZ1</i> con el gen marcador <i>URA3</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEM-GAT2	Derivado de pGEM-T. Porta un fragmento de 1895 pb que contiene la ORF de <i>GAT2</i> más 300 y 314 pb correspondientes a las regiones 5' y 3' no codificantes	GMN
pGEMGAT2- <i>URA3</i>	Derivado de pGEM-GAT2. Contiene un fragmento de 1951 pb con el gen marcador <i>URA3</i> obtenido de pBSURA3, amp <sup>R</sup> .	GMN
pGEMΔgat2:: <i>LEU2</i>	Derivado de pGEM-GAT2. Contiene el fragmento de 3278 pb usado para la interrupción de <i>GAT2</i> con el gen marcador <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup>	GMN
pGEMΔgat2::ble	Derivado de pGEM-GAT2. Contiene el fragmento de 3098 pb usado para la interrupción de <i>GAT2</i> con el gen de resistencia a zeocina <i>ble</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo

Plásmido	Características	Origen
pGEM-ble	Derivado de pGEM-T. Porta un fragmento de 1312 pb que contiene el gen de resistencia a zeocina <i>ble</i> , amp <sup>R</sup>	GMN
pGEM-PMC1	Derivado de pGEM-T easy. Contiene un fragmento de 3260 bp con el gen <i>PMC1</i> , amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-PMC1::LEU2	Derivado de pGEM-PMC1. Contiene el fragmento de 3067 pb usado para la interrupción de <i>PMC1</i> con el gen marcador <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pANL31	Derivado de pBluescript. Contiene el gen sin codón de inicio, eGFP zeo <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup>	(Leao-Helder <i>et al.</i> , 2003)
pHA1	Derivado de pANL31 donde el gen eGFP ha sido reemplazado por un fragmento de PCR que contiene 6 copias del epítipo HA, zeo <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup>	GMN
pGEM-URE2-HA	Derivado de pGEM-T easy. Contiene el gen <i>URE2</i> sin codón de inicio y de parada (904 bp), amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pURE2-HA	Derivado de pHA1. Contiene el gen <i>URE2</i> sin codón de inicio y de parada (904 bp) fusionado en fase al epítipo 6HA, zeo <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEMGAT1 GFP	Derivado de pGEM-T easy. Contiene 1121 pb de la región 3' del gen <i>GAT1</i> sin codón de parada, amp <sup>R</sup> .	GMN
pGAT1-HA	Derivado de pHA1. Contiene 1121 pb de la región 3' del gen <i>GAT1</i> sin codón de parada fusionado en fase al epítipo 6HA, zeo <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEM-GAT2	Derivado de pGEM-T easy. Contiene 1244 pb de la región 3' del gen <i>GAT2</i> sin codón de parada, amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGAT2-HA	Derivado de pHA1. Contiene 1244 pb de la región 3' del gen <i>GAT2</i> sin codón de parada fusionado en fase al epítipo 6HA, zeo <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-YNA1-HA	Derivado de pGEM-T easy. Contiene un fragmento de 1398 pb del gen <i>YNA1</i> sin codón de parada, amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pYNA1-HA	Derivado de pHA1. Contiene un fragmento de 1398 pb del gen <i>YNA1</i> sin codón de parada fusionado en fase al epítipo 6HA, zeo <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-YNA2-HA	Derivado de pGEM-T easy. Contiene un fragmento de 1633 pb del gen <i>YNA2</i> sin codón de parada, amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pHPI 359	Derivado de Yep356 donde se ha reemplazado el gen <i>URA3</i> de <i>S. cerevisiae</i> por un fragmento de 2.5 kpb que contiene el gen marcador <i>LEU2</i> de <i>H. polymorpha</i> obtenido de p18B1, amp <sup>R</sup> .	(Brito <i>et al.</i> , 1999)

Plásmido	Características	Origen
pGEM-promENA1	Derivado de pGEM-T easy. Porta un fragmento de 1203 pb que comprende 1164 pb de la región 5' no codificante y 39 pb de la ORF del gen <i>ENA1</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pENA1-lacZ	Derivado de pHPI 359. Contiene el gen reportero <i>lacZ</i> bajo el control de la región 5' no codificante del gen <i>ENA1</i> , <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEM-promPMR1	Derivado de pGEM-T easy. Porta un fragmento de 1048 pb que comprende 1009 pb de la región 5' no codificante y 39 pb de la ORF del gen <i>PMR1</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pPMR1-lacZ	Derivado de pHPI 359. Contiene el gen reportero <i>lacZ</i> bajo el control de la región 5' no codificante del gen <i>PMR1</i> , <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pAMS367	Derivado de pJL638. Contiene el tetrámero CDRE obtenido de pAMS341, <i>ScURA3</i> , amp <sup>R</sup> .	(Stathopoulos y Cyert, 1997)
pAMS367-LEU2	Derivado de pAMS367. Porta el gen <i>ScURA3</i> interrumpido por el gen <i>HpLEU2</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGEM-expPMR1	Derivado de pGEM-T. Porta un fragmento de 3967 pb que contiene la ORF de <i>PMR1</i> más 705 y 513 pb correspondientes a las regiones 5' 3' no codificantes	Este trabajo
pGEM-expPMR1-LEU2	Derivado de pGEM-PMR1. Contiene un fragmento de 1.5 kpb con el gen marcador <i>LEU2</i> obtenido de pGEM-LEU2, amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-LEU2(StuI)	Derivado de pGEM-T easy. Contiene el gen <i>LEU2</i> flanqueado por dianas StuI, amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pRR529	Contiene el gen <i>ScURE2</i>	(Baxa <i>et al.</i> , 2003)
pGEMORF ScURE2	Derivado de pGEM-T easy. Porta un fragmento de 1071 pb que contiene el gen <i>ScURE2</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pYNR-EX(LEU2)	Usado para expresar el gen <i>ScURE2</i> en <i>HpΔure2</i> . Porta la secuencia promotora y terminadora del gen <i>YNR1</i> , <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup> .	(Perdomo <i>et al.</i> , 2002)
pYNR1-EX-ScURE2	Derivado de pYNR-EX. Contiene la ORF del gen <i>ScURE2</i> , <i>LEU2</i> , amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pRSET-C	Derivado de pUC. amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pGEM-URE2	Derivado de pGEM-T. Porta un fragmento de 2048 pb que contiene la ORF completa de <i>URE2</i> más 906 y 145 pb correspondientes a las regiones 5' y 3' no codificantes respectivamente, amp <sup>R</sup> .	GMN

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>	<b>Origen</b>
pGEMORF URE2	Derivado de pGEM-T easy. Contiene la ORF completa del gen <i>URE2</i> , amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pRSET-URE2	Derivado de pRSET-C. Contiene la ORF completa del gen <i>URE2</i>	Este trabajo

---

**APÉNDICE IV. Descripción del genotipo de las cepas bacterianas utilizadas**

<i>ara</i>	Su mutación causa incapacidad para crecer en arabinosa
<i>dam/dcm</i>	Impide la metilación endógena de la adenina de las secuencias GATC ( <i>dam</i> ) o de las citocinas en las secuencias C*CAGG y C*CTGG ( <i>dcm</i> ). Permite propagar DNA que requiere el corte con ciertas enzimas de restricción ( <i>AvaII</i> , <i>BclI</i> ,..)
<i>deoR</i>	Represor del operón <i>deo</i> . Este operón está implicado en el catabolismo de nucleósidos.
DE3	T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> . Se requiere IPTG para la inducción de la T7 RNA polimerasa
<i>endA</i>	Mutación en la endonucleasa no específica Endonucleasa I. Su mutación mejora el rendimiento y calidad de los plásmidos amplificados
<i>F'</i>	Plásmido usado para la generación de ADN monocatenario tras la infección con el fago M13.
<i>galK</i>	Necesario para la utilización de la galactosa
<i>galT</i>	Necesario para la utilización de la galactosa
<i>gyrA</i>	Mutación en la ADN girasa que confiere resistencia a ácido naladixico
<i>hsd</i>	Mutaciones en el sistema de metilación y restricción que permite reconocer el ADN foráneo.
<i>lacI</i>	Codifica el represor <i>lac</i> que controla la expresión de promotores que portan el operador <i>lac</i> ; el IPTG se une al represor <i>lac</i> y desreprime el promotor.
<i>lacY</i>	Bloquea el uso de lactosa.
<i>lacZ</i>	$\beta$ -D-galactosidasa; utilización de lactosa. La mutación en <i>lacZ</i> produce colonias blancas en presencia de X-gal



<i>lacZΔM15</i>	Mutación de <i>lacZ</i> ; deleción del dominio N-terminal de la β-D-galactosidasa que permite la complementación α por el segmento presente en pBluescript o lambda ZAP II para producir una β-D-galactosidasa funcional
<i>leu</i>	Requiere leucina para el crecimiento en medio mínimo
<i>ompT</i>	Proteasa de la membrana externa. Su mutación reduce la degradación de proteínas heterólogas
<i>pLysS</i>	Este plásmido produce la Lisozima T7 para reducir la expresión basal del gen de interés.
<i>proAB</i>	Los mutantes requieren prolina para crecer en medio mínimo
<i>recA</i>	Su mutación impide la recombinación general y produce sensibilidad a luz UV
<i>relA</i>	Permite la síntesis de ARN en ausencia de síntesis proteica
<i>rspL</i>	Confiere resistencia a estreptomycin. Carece de la proteína S12 de la subunidad 30 S del ribosoma.
<i>supE</i>	Supresor de mutaciones ámbar. Algunos fagos necesitan este gen mutado para crecer
<i>Tet<sup>r</sup></i>	Resistencia a la tetraciclina
<i>thi-1</i>	Los mutantes requieren vitamina B1 (tiamina) para crecimiento en medio mínimo
<i>Tn10</i>	Transposón que normalmente porta el gen <i>Tet<sup>r</sup></i>
<i>tonA</i>	Confiere resistencia a los bacteriófagos líticos T1, T5 y f80.
<i>traD,D36</i>	Previene la transferencia del episoma F´
<i>tsx</i>	Confiere resistencia al fago T6 y a la colicina K

# *Bibliografía*

---

## VII. BIBLIOGRAFÍA

## A

**Agaphonov MO, Poznyakovski AI, Bogdanova AI and Ter-Avanesyan MD. 1994.** Isolation and characterization of the *LEU2* gene of *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. **10(4)**: 509-513.

**Alepuz PM, Cunningham KW and Estruch F. 1997.** Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress activated *ENA1* gene. *Mol. Microbiol.* **26**: 91-98.

**Andrianopoulos A, Kourambas S, Sharp JA, Davis MA and Hynes MJ. 1998.** Characterization of the *Aspergillus nidulans* *NmrA* gene involves in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* **180**:1973-1977.

**Antebi GJ and Fink. 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.

**Ariño J, Ramos J and Sychrová H. 2010.** Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 95-120.

**Armstrong RN. 1997.** Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 2-18.

**Avery AM and Avery SV. 2001.** *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **276 (36)**: 33730-33735.

**Ávila J, González C, Brito N and Siverio JM. 1998.** Clustering of the *YNA1* gene encoding a  $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$  transcriptional factor in the yeast *Hansenula polymorpha* with the nitrate assimilation genes *YNT1*, *YN11* and *YNR1*, and its involvement in their transcriptional activation. *Biochem. J.* **335**: 647-652.

**Ávila J, Gonzalez C, Brito N, Machin M, Perez D and Siverio JM. 2002.** A second  $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$  transcriptional factor encoded by the *YNA2* gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. **19**: 537-544.

**Ávila J, Pérez MD, Brito N, González C and Siverio JM. 1995.** Cloning and disruption of *YNR1* gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett.* **366**: 137-42.

## B

**Bader T, Bodendorfer B, Schröppel K and Morschhäuser J. 2003.** Calcineurin Is Essential for Virulence in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **71**: 5344 – 5354.

**Bai M, Zhou, JM, and Perrett S. 2004.** The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms. *J. Biol. Chem.* **279 (48)**: 50025-50030.

**Banuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL and Potier S. 1998.** The NHA antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology.* **144**: 2749-2758.

**Banuelos MA, Ruiz MC, Jimenez A, Souciet JL, Potier S and Ramos J. 2002.** Role of Nha1 antiporter in regulating  $\text{K}^+$  influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **19**: 9-15.

**Batiza AF, Schulz T and Masson PH. 1996.** Yeast Respond to Hypotonic Shock with a Calcium Pulse. *J. Biol. Chem.* **271**: 23357 - 23362.

**Baudin-Baillieu A, Fernandez-Bellot E, Reine F, Coissac E and Cullin C. 2003.** Conservation of the Prion Properties of Ure2p through Evolution. *Mol.Biol.Cell* **14 (8)**: 3449-3458.

- Baxa U, Taylor KL, Wall JS, Simon MN, Cheng N, Wickner RB and Steven AC.** 2003. Architecture of Ure2p prion filaments: the N-terminal domains form a central core fiber. *J. Biol. Chem.* **278**: 43717-43727.
- Beck T and Hall MN.** 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature.* **402**:689-92.
- Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF and Zheng XF.** 2000. Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p and phosphatases. *J. Biol. Chem.* **275**: 35727-35733.
- Blinder D and Magasanik B.** 1995. Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene. *J. Bacteriol.* **177**: 4190-193.
- Blinder D, Coschigano PW and Magasanik B.** 1996. Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulatory Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**: 4734-4736.
- Boeckstaens M, André B and Marni AM.** 2007. The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol. Microbiol.* **64**(2): 534-546.
- Boustany LM and Cyert MS.** 2002. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes & Dev.* **16**: 608-619.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
- Breuder T, Hemenway CS, Movva NR, Cardenas ME and Heitman J.** 1994. Calcineurin is essential in cyclosporine A- and FK506-sensitive yeast strains. *PNAS.* **91**: 5372-5376.
- Brito N, Ávila J, Pérez MD, González C and Siverio JM.** 1996. The genes *YNI1* and *YNR1*, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha* are clustered and coordinately regulated. *Biochem. J.* **317**:89-95.
- Brito N, Pérez MD, Perdomo G, González C, García-Lugo P and Siverio JM.** 1999. A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct *lacZ* fusions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 23-29.

## C

**Caccuri AM, Antonini G, Allocati N, Di Ilio C, De Maria F, Innocenti F, Parker MW, Masulli M, Lo B, Turella P, Federici G and Ricci FG.** 2002. GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*. A snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* **277** (21): 18777-18784.

**Caddick MX.** 1994. Nitrogen metabolite repression. *Prog. Ind. Microbiol.* **29**:323-53.

**Canfield DE, Glazer AN and Falkowski PG.** 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science.* **330**:192-196.

**Cantley LC and Neel BG.** 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *PNAS.* **96**: 4240 - 4245.

**Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ and Heitman J.** 1999. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & Dev.* **13**: 3271-3279.

**Catty P, de Kerchove d'Exaerde A and Goffeau A.** 1997. The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.* **409**: 325-332.

- Chrestensen CA, Starke DW and Mieyal JJ.** 2000. Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**: 26556-26565.
- Cho MH, Chen Q, Okpodu CM and Boss WF.** 1992. Separation and quantification of [<sup>3</sup>H]inositol phospholipids using thin-layer-chromatography and a computerized <sup>3</sup>H imaging scanner, LC-GC. *Mag. Separ. Sci.* **10**: 464-468.
- Clipstone NA, Fiorentino DF and Crabtree GR.** 1994. Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J. Biol. Chem* **269**: 26431-26437.
- Coffman JA, Rai R and Cooper TG.** 1995. Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression- sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 6910 – 6918
- Coffman JA, Rai R, Cunningham T, Svetlov V and Cooper TG.** 1996. Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:847-858.
- Coffman JA, Rai R, Loprete DM, Cunningham T, Svetlov V and Cooper TG.** 1997. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 3416-3429.
- Collinson EJ, Wheeler GL, Garrido EO, Avery AM, Avery SV and Grant CM.** 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **277** (19):16712-16717.
- Collinson EJ and Grant CM.** 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **278** (25): 22492-22497.
- Choi JH, Lou W and Vancura A.** 1998. A novel membrane-bound glutathione s-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 29915-29922.
- Clipstone NA and Crabtree GR.** 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* **357**: 695-697.
- Cooper TG.** 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En: Strathern JN, Jones EW, Broach JR (Eds.). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbour, NY, pp. 39-99.
- Cooper TG.** 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 223-38.
- Cove DJ.** 1972. Chlorate toxicity in the fungus. *Biochem J.* **127**:19P
- Cove DJ.** 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. Studies in mutants altered in nitrate assimilation. *Mol. Gen. Genet.* **146**(2): 147-159.
- Coschigano PW and Magasanik B.** 1991. The *URE2* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione S-transferases. *Mol. Cell. Biol.* **11** (2): 822-832.
- Cox KH, Rai R, Distler M, Daugherty JR, Coffman JA and Cooper TG.** 2000. *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J. Biol. Chem.* **275**:17611-17618.
- Crawford NM and Arst HN.** 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**:115-146.

- Crespo JL, Daicho K, Ushimaru T and Hall MN.** 2001. The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 34441-34444.
- Crespo JL and Hall MN.** 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 579-591.
- Cronin SR, Rao R and Hampton RY.** 2002. Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J. Cell Biol.* **157**: 1017-1028.
- Cruz MC, Fox DS, and Heitman J.** 2001. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* **20**: 1020-1032.
- Csutora P, Su Z, Kim HY, Bugrim A, Cunningham KW, Nuccitelli R, Keizer JE, Hanley MR, Blalock JE and Marchase RB.** 1999. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organelles calcium stores. *PNAS.* **96**: 121-126.
- Cui J, Kaandorp JA, Sloot PM, Lloyd CM and Filatov MV.** 2009. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res.* 9(8): 1137-1147.
- Cunningham TS and Cooper TG.** 1992. Expression of the *DAL80* gene, whose product is homologous to the GATA factors and is a negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2454.
- Cunningham TS and Fink GR.** 1994a. Ca<sup>2+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* **196**: 157-166.
- Cunningham TS and Fink GR.** 1994b. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *J. Cell. Biol.* **124**: 351-363.
- Cunningham TS and Fink GR.** 1996. Calcineurin inhibits *VCX1*-dependent H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and induces Ca<sup>2+</sup>-ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2226-2237.
- Cunningham TS, Andhare R and Cooper TG.** 2000. Nitrogen catabolite repression of *DAL80* expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**:14408-14.
- Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D and Thorner J.** 1991. Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *PNAS.* **88**: 7376-7380.
- Cyert MS and Thorner J.** 1992. Regulatory subunit (*CNBI* gene product) of yeast Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3460-3469.
- D**
- da Silva Ferreira ME, Heinekamp T, Hartl A, Brakhage AA, Semighini CP, Harris SD, Savoldi M, de Gouvea PF, de Souza Goldman MH and GH Goldman.** 2007. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genet. Biol.* **44**(3): 219-30.
- Davis TN.**1995. Calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **30**: 339-358.
- Denis V and Cyert MS.** 2002. Internal Ca<sup>2+</sup> release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J. Cell Biol.* **156**:29-34.
- De Nadal E, Alepuz PM and Posas F.** 2002. Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* **3**: 735-740.
- Dunn-Coleman NS, Tomsett AB and Garret RH.** 1981. The regulation of nitrate assimilation in *Neurospora crassa* biochemical analysis of the *nmr-1* mutants. *Mol. Gen. Genet.* **182**:234-9.

**Durr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH and Rudolph HK.** 1998. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Biol. Cell.* **9**: 1149-1162.

## E

**Eilam Y.** 1982a. The effect of monovalent cations on calcium efflux in yeasts. *Biochem. Biophys. Acta.* **269**: 7273-7278.

**Eilam Y.** 1982.b. Studies on calcium efflux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios.* **35**: 99-110.

**Eilam Y, Lavi H and Grossowicz N.** 1985. Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis maintained by a vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  transport system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 623-629.

**Eilam Y and Othman M.** 1990. Activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by metabolic substrates in *Saccharomyces cerevisiae*: role of membrane potential and cellular ATP levels. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 861-866.

**Eilam Y, Othman M and Halachmi D.** 1990. Transient increase in  $\text{Ca}^{2+}$  influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: effects of intracellular acidification and cAMP levels. *Microbiology.* **136**: 2537 – 2543.

**Estrada E, Agostinis P, Vanderheede JR, Goris J, Merlevede W, Francois J, Goffeau A and Ghislain M.** 1996. Phosphorylation of yeast plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase by casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **271**: 32064-32072.

## F

**Faber KN, Harder W, Ab G and Veenhuis M.** 1995. Review: Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast.* **11**:1331-1344.

**Farcasanu IC, 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 cells. *Eur. J. Biochem.* **232** (3):712-717.

**Feller MR, Boeckstaens M, Marini AM and Dubois E.** 2006. Transduction of the nitrogen signal activating Gln3-mediated transcription is independent of Npr1 kinase and Rsp5-Bul1/2 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**(39): 28546-28554.

**Ferrando A, Kron SJ, Rios G, Fink GR and Serrano R.** 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5470-5481

**Fox DS, Cruz MC, Sia RA, Ke H, Cox GM, Cardenas ME, and Heitman J.** 2001. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**(4): 835-49.

**Fox DS and J Heitman.** 2002. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. *Bioessays.* **24**(10): 894-903.

**Fu L, Miseta A, Hunton D, Marchase RB, and Bedwell DM.** 2000. Loss of the major isoform of phosphoglucomutase results in altered calcium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 5431 – 5440.

**Fraser JA, Davis MA and Hynes MJ.** 2002. A Gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to *URE2* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Appl. Envir. Microbiol.* **68**: 2802-2808.

## G

**Georis I, Feller A, Vierendeels F and Dubois E.** 2009. The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3803-3815.

- Garrett-Engle P, Moilanen B and Cyert MS.** 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.
- Georis I, Tate JJ, Cooper TG and Dubois E.** 2008. Tor Pathway Control of the Nitrogen-responsive *DAL5* Gene Bifurcates at the Level of Gln3 and Gat1 Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **283**: 8919 - 8929.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J and André B.** 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 3065-3086.
- González C and Siverio JM.** 1992. Effect of nitrogen source on the levels of nitrate reductase in the yeast *Hansenula anomala*. *J. Gen Microbiol.* **138**:1445-1451.
- Goffeau A and Slayman CW.** 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys Acta.* **639(3-4)**: 197-223.
- Goossens A, de la Fuente N, Forment J, Serrano R and Portillo F.** 2000. Regulation of yeast H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7654-7661.
- Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A and Crabtree GR.** 2001. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell.* **105**: 863-875.
- Groppi S, Belotti F, Brandao RL, Martegani E and Tisi R.** 2011. Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin. *Cell Calcium.* **49**: 376-386.
- Guerini D, Montell C and Klee CB.** 1992. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of *Drosophila melanogaster* calcineurin. *J. Biol Chem.* **267**: 22542-22549.
- Guerini D and Klee CB.** 1991. Structural diversity of calcineurin, a Ca<sup>2+</sup> and calmodulin- stimulated protein phosphatase. *Adv. Protein Phosphatases.* **6**: 391-410.
- Guillén RM.** 2006. Aislamiento de genes implicados en regulación de la vía de asimilación de nitrato y la homeostasis catiónica en la levadura *Hansenula polymorpha*. Tesis doctoral.
- H**
- Halachmi D and Eilam Y.** 1996. Elevated cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentrations and massive Ca<sup>2+</sup> accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *FEBS Lett.* **392**: 194-200.
- Hall JL.** 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* **53**: 1-11.
- Hanahan D.** 1986. Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning, DM Glover, ed. (Oxford IRL Press), pp 121-127.
- Hardwick JS, Kuruvilla, FG, Tong JK, Shamji, AF and Schreiber, SL.** 1999. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signalling pathways directly controlled by the Tor proteins. *PNAS.* **96**: 14866-14870.
- Hartley AD, Bogaerts S and Garrett S.** 1996. cAMP inhibits bud growth in a yeast strain compromised for Ca<sup>2+</sup> influx into the Golgi. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 556-564.
- Hashimoto Y, Perrino BA and Soderling TR.** 1990. Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J. Biol. Chem.* **265**: 1924-1927.
- Hemenway CS and Heitman J.** 1999. Calcineurin: structure, function, and inhibition. *Cell Biochem. Biophys.* **30**: 115–



**Hendey B, Klee CB and Maxfield FR.** 1992. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science*. **258**: 296-299.

**Heitman J, Movva NR and Hall MN.** 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. **253**: 905 – 909.

**Hubatsch I, Ridderstrom M and Mannervik B.** 1998. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* **330**: 175–179.

**Husi H, Luyten MA and Zurini MGM.** 1994. Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site interaction on calcineurin. *J. Biol. Chem.* **269**: 14199-14204.

## I

**Iida H, Sakaguchi S, Yagawa Y and Anraku Y.** 1990a. Cell cycle control by  $Ca^{2+}$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 21216-21222

**Iida H, Yagawa Y and Anraku Y.** 1990b. Essential role for induced  $Ca^{2+}$  influx followed by  $[Ca^{2+}]_i$  rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. A study of  $[Ca^{2+}]_i$  in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *J. Biol. Chem.* **265**: 13391-13399

**Iida H, Nakamura H, Ono T, Okumura M and Anraku Y.** 1994. *MIDI*, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for  $Ca^{2+}$  influx and mating. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 8259-8271.

**Ishihara S, Hirata A, Nogami S, Beauvais A, Latge J-P and Ohya Y.** 2007. Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **6**: 143 – 156.

**Ishikawa T.** 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 463-468.

## J

**Jiang Y, Li H, Zhu I, Zhou JM and Perret S.** 2004. Amyloid nucleation and hierarchical assembly of Ure2p fibrils. Role of asparagine/glutamine repeat and non-repeat regions of the prion domains. *J. Biol. Chem.* **279**: 3361-3369.

## K

**Kafadar KA and Cyert M.** 2004. Integration of stress responses: Modulation of calcineurin signalling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot. Cell.* **3**: 1147-1153.

**Kaibuchi K, Miyajima A, Arai K and Matsumoto K.** 1986. Possible involvement of RAS-encoded proteins in glucose-induced inositolphospholipid turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS.* **83**: 8172-8176.

**Kakalis LT, Kennedy M, Sikkink R, Rusnak F and Armitage IM.** 1995. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Lett.* **362**: 55-58.

**Kim HG, Park KN, Cho YW, Park EH, Fuchs JA and Lim CJ.** 2001. Characterization and regulation of glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys. Acta.* **1520**: 179-185.

**Kincaid RL, Nightingale MS and Martin BM.** 1988. Characterization of a cDNA clone encoding the calmodulin-binding domain of mouse brain calcineurin. *PNAS.* **85**: 8983-8987.

**Kincaid, R.** 1993. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganism to man: a study in structural conservation and biological diversity. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **27**: 1-23.

- König S, Hoffmann M, Mosblech A and Heilman I.** 2008. Determination of content and fatty acid composition of unlabeled phosphoinositide species by thin-layer chromatography and gas chromatography. *Anal Biochem.* **378 (2):** 197-201.
- Kosola KR and Bloom AJ.** 1996. Chlorate as a transport analog for nitrate absorption by roots of tomato. *Plant Physiol.* **110(4):** 1293-1299.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davies RW and Arst HN Jr.** 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.* **9:**1355-1364.
- Kulkarni AA, Abul-Hamd AT, Rai R, El Berri H and Cooper TG.** 2001. Gln3 nuclear localization and interaction with Ure2 *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276:** 32136-32144.
- Kuno T, Tanaka H, Mukai J, Chang C, Hiraga K, Miyakawa T and Tanaka C.** 1991. cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180:** 1159-1163.
- L**
- Labrou NE, Mello LV and Clonis YD.** 1991. Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem J.* **358 (Pt 1):**101-110.
- Lamb TM, Xu W, Diamond A and Mitchell AP.** 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol Chem.* **276:** 1850-1856.
- Langdon T, Sheerins A, Ravagnani A, Gielkens M, Caddick MX and Arst HN.** 1995. Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus* transcription factor mediating nitrogen metabolite repression. *Mol. Microbiol.* **17:** 877-888.
- Lawson MA and Maxfield FR.** 1995. Ca(2+) - and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature.* **377:** 75-79.
- Leao-Helder AD, Krikken AM, van der Klei IJ, Kiel JAKW and Veenhuis, M.** 2003. *J. Biol Chem.* **278:** 40749-40756.
- Levine DW and Cooney CL.** 1973. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl. Microbiol.* **26:** 982-990.
- Liew CK, Simpson RJY, Kwan AHY, Crofts LA, Loughlin FE, Matthews JM, Crossley M and Mackay JP.** 2005. Zinc fingers as protein recognition motifs: Structural basis for the GATA-1/Friend of GATA interaction. *PNAS.* **102:**583-588.
- Liu Y, Ishii M, Tokai H, Tsutsumi O, Ohke R, Akada K, Tanaka E, Tsuchiya S Fukui S and 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.
- Locke EG, Bonilla M, Liang L, Takita Y and Cunningham KW.** 2000. A homolog of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels stimulated by depletion of secretory Ca<sup>2+</sup> in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 6686-6694.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P and Hall MN.** 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10:** 457-468.

## M

- Machín F, Medina B, Navarro F, Pérez MD, Veenhuis M, Tejera P, Lorenzo H, Lancha A and Siverio J.M.** 2004. The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. **21**:265-276.
- Magasanik B and Kaiser CA.** 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **290**:1-18.
- Magasanik B.** 2005. The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*. **102**: 16537-16538.
- Mannazzu I, Guerra E, Strabioli R, Pediconi D and Fatichenti F.** 1998. The vanadate tolerant yeast undergoes cellular reorganization during growth in, and recovery from, the presence of vanadate. *Microbiol.* **144**: 2589-2597.
- Mannervik, B.** 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol Biol* **57**: 357-417.
- Mannervik B, Cameron AD, Fernandez E, Gustafsson A, Hansson LO, Jemth P, Jiang F, Jones TA, Larsson AK, Nilsson LO, Olin B, Pettersson PL, Ridderstrom M, Stenberg G and Widersten M.** 1998. An evolutionary approach to the design of glutathione-linked enzymes. *Chem. Biol. Interact.* **111-112**:15-21.
- Manning BD, Logsdon MN, Lipovsky AI, Abbott D, Kwiatkowski DJ and Cantley LC.** 2005. Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking *Tsc2*. *Genes Dev.* **19**: 1773 - 1778.
- Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER and Bach ME** 1998. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell*. **92**: 39-49.
- Márquez JA and Serrano R.** 1996. Multiple transduccion pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**: 89-92.
- Martín Y, Gonzalez YV, Cabrera E, Rodríguez C and Siverio JM.** Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *J. Biol. Chem.* **286**: 27225 - 27235
- Marzluf GA.** 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:17-32.
- Masison DC, Maddelein ML and Wickner RB.** 1997. The prion model for [URE3] of yeast: spontaneous generation and requirements for propagation. *PNAS*. **94**: 12503-12508.
- Masison DC and Wickner RB.** 1995. Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion containing cells. *Science*. **270**: 93-95.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US and Cunningham KW.** 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin- dependent transcriptional factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Dev.* **11**: 3445-3458.
- Matsuo Y, Asakawa K, Toda T and Katayama S.** 2006. A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70(8)**: 1992-4.
- Mazur P, Morin N, Baginsky M, El-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB and Foor F.** 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-β-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5671-5681.
- Medina B.** 2008. Los factores transcripcionales del tipo GATA en el metabolismo del nitrógeno y la homeostasis catiónica en la levadura *Hansenula polymorpha*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna.

- Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R and Larrinoa IF.** 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **425**: 323-328.
- Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Serrano R and Larrinoa IF.** 2001. Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 801-811.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A and Pardo JM.** 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269** (12): 8792-8796.
- Minehart PL and Magasanik B.** 1991. Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **11**:6216-28.
- Mizunuma M, Hirata D, Miyahara K, Tsuchiya E. and Miyakawa T.** 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature.* **392**: 303-306.
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR and Olson EN.** 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* **93**: 215-228.
- Moller JV, Juul B and le Maire M.** 1996. Structural organization, ion transport and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**:1-51.
- Morais JOF and Maia MHD.** 1959. Estudos de microrganismos encontrados em leitos de despéjos de caldas de destilarias de Pernambuco. II. Uma nova espécie de *Hansenula*, *H. polymorpha*. Anais da Escola Superior de Quimica Universidade do Recife **I**:15-20.
- Mori I, Iida H, Tsuji FI, Isobe M, Uozumi, N and Muto S.** 1998. Salicylic acid induces a cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation in yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 986-989.
- Morozov IY, Negrete-Urtasun S, Tilburn J, Jansen CA, Caddick MX and Arst HN.** 2006. Nonsense-mediated mRNA decay mutation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* **5**:1838-1846.
- Moser MJ, Geiser JR and Davis TN.**1996. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.***16**: 4824 - 4831.
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR and Serrano R.** 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 y Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3328-3337.
- Muller EM, Locke EG and Cunningham KW.** 2001. Differential Regulation of Two Ca<sup>2+</sup> Influx Systems by Pheromone Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **159**: 1527 - 1538.
- Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN and Rosenthal N.** 1999. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.* **400**: 581-585.

## N

**Nakajima-Shimada J, Iida H, Tsuji FI and Anraku Y.** 1991. Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *PNAS.* **88**: 6878-6882.

**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** (11):4063-4071.

- Navarro F, Perdomo G, Tejera P, Medina B, Machín F, Guillen RM, Lancha A and Siverio JM.** 2003. The role of the nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*. **4**:149-55.
- Navarro FJ, Machín F, Martín Y and Siverio JM.** 2006. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 13268 - 13274.
- Navarro FJ, Martín Y and Siverio JM.** 2008. Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. *J. Biol. Chem.* **283**: 31208-31217.
- Nay B, Fournier D, Baudras A and Baudras B.** 1999. Mechanism of an insect glutathione S-transferase: kinetic analysis supporting a rapid equilibrium random sequential mechanism with housefly II isoform. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29** (1):71-79.
- O**
- Oakley AJ.** 2005. Glutathione S-transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 716-723.
- Oliveira EEM, Martins AS, Carvajal E and Bon EPS.** 2003. The role of the GATA factors Gln3p, Nil1p, Dal80p and the Ure2p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **20**:31-37.
- Oliveira EMM, Mansure JJ and da Silva Bon EP.** 2005. Gln3p and Nil1p regulation of invertase activity and *SUC2* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. **5**:605-609.
- P**
- Page MJ and Di Cera E.** 2006. Role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in enzymes function. *Physiol. Rev.* **86**: 1049-1092.
- Pan H, Feng B and Marzluf GA.** 1997. Two distinct protein-protein interactions between the NIT2 and NMR regulatory proteins are required to establish nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **26**: 721-729.
- Pearson WR.** 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol.* 401:186-204.
- Perdomo, G Navarro FJ, Medina B, Machín, F, Tejera P and Siverio JM.** 2002. Tobacco *Nia2* cDNA functionally complements a *Hansenula polymorpha* yeast mutant lacking nitrate reductase. A new expression system for the study of plant proteins involved in nitrate assimilation. *Plant Mol. Biol.* **50**: 405-413.
- Perego P and Howell SB.** 1997. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**: 312-318.
- Pereira MB, Tisi R, Fietto LG, Cardoso AS, Franca MM, Carvalho FM, Tropic MJ, Martegani E, Castro IM and Brandao RL.** 2008. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**:622-630.
- Pérez MD, González C, Brito N and Siverio JM.** 1997. The *YNT1* gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes *YNI1* and *YNR1* encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochem. J.* **321**:397-403.
- Pérez-Valle J, Jenkins H, Merchan S, Montiel V, Ramos J, Sharma S, Serrano R, and Yenush L.** 2007. Key role for intracellular K<sup>+</sup> and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 5725 - 5736.

- Perlin DS, Brown CL and Haber JE.** 1988. Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pmal mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263 (34)**:18118-18122.
- Pittman JK, Cheng NH, Shigaki T, Kunta M and Hirschi KD.** 2004. Functional dependence on calcineurin by variants of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchanger Vcx1p. *Mol. Microbiol.* **54(4)**: 1104-1116.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:345-355.
- Platara M, Ruiz A, Serrano R, Palomino A, Moreno F and Ariño A.** 2006. The transcriptional response of the yeast  $\text{Na}^{+}$ -ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **281**:36632-36642.
- Platt A, Langdon H, Arst HN, Kirk JrD Tollervey D, Sánchez JM and Caddick MX.** 1996. Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the Aspergillus transcription factor AREA and the 3' untranslated region of its mRNA. *EMBO J.* **15**: 2791-2801.
- Plochocka-Zulinska D, Rasmussen G and Rasmussen C.** 1995 Regulation of calcineurin gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **270**: 24794-24799.
- Portillo, F.** 2000. Regulation of plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**: 31-42.
- Powlson DS, Addiscott TM, Benjamin N, Cassman KG, Kok TM, Grinsven HV, L'hirondel JL, Avery AA and Kessel CV.** 2008. When Does Nitrate Become a Risk for Humans? *J. Environ. Qual.* **37**:391-295.
- Pozos TC, Sekler I and Cyert MS.** 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**: 3730 - 3741.
- Prior C, Potier S, Souciet JL and Sychrova H.** 1996. Characterization of the NHA gene encoding a  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter of the *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **387**: 89-93.
- Proft M and Serrano R.** 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:537-546.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Ariño J, Serrano R and Posas F.** 2001. Regulation of Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP Kinase in response to osmotic stress. *EMBO. J.* **20**: 1123-1133.
- Putney, JW Jr.** 1992. Inositol phosphates and calcium entry. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **26**: 143-160.

## R

**Rai R, Tate JJ and Cooper TG.** 2003. Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. *J. Biol. Chem.* **278**: 12826 – 12833.

**Rai R and Cooper TG.** 2005. In vivo specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **22(5)**: 343-358.

**Ramezani-Rad M, Hollenberg CP, Lauber J, Wedler H, Griess E, Wagner C, Albermann K, Hani J, Piontek M, Dahlems U and Gellissen G.** 2003. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Res.* **4**:207-15.

**Reyes JC, Muro-Pastor MI and Florencio FJ.** 2004. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and *Rice*. *Plant Physiology.* **134**: 1718-1732.

- Ríos G, Fernando A and Serrano R.** 1997. Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the *HAL1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**: 515-528.
- Rodríguez C, Tejera P, Medina B, Guillén R, Domínguez A, Ramos J and Siverio JM.** 2010. Ure2 acts on nitrogen de-repression and salt tolerance via Ca<sup>2+</sup> homeostasis and calcineurin in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.* **285**: 37551-37560.
- Rohde J, Heitman J and Cárdenas ME.** 2001. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J. Biol. Chem.* **276**: 9583-9586.
- Rossjohn J, Board PG, Parker MW and Wilce MC.** 1996. A structurally derived consensus pattern for theta class glutathione transferases. *Protein Eng.* **9**: 327-332.
- Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow LS, Mao JI and Moir DT.** 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell*. **58(1)**: 133-45.
- Rusnak F and Mertz P.** 2000. Calcineurin. Form and function. *Physiol Rev.* **80**:1483-1521.
- Rutherford JC and Bird AJ.** 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell.* **3**:1-13.
- Ruiz A and Ariño J.** 2007. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ENA* sodium ATPase system. *Eukariot. Cell.* **6**:2175-2183.
- S**
- Sakuma K, Nishikawa J, Nakao R, Watanabe K, Totsuka T, Nakano H, Sano, M and Yasuhara M.** 2003. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathol.* **105**: 271-280.
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E and Takahashi K.** 1999. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* **274 (5)**: 2866-2871.
- Sambrook J and Russell DW.** 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sellick CA and Reece RJ.** 2005. Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 405-412.
- Serrano R.** 1983. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**: 11-14.
- Serrano R.** 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell Regul.* **23**:87-126.
- Serrano R.** 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **165**: 1-52.
- Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR and Ariño J.** 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for calcium mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46**: 1319-1333.
- Shamji AF, Kuruvilla FG and Schreiber SL.** 2000. Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr. Biol.* **10(24)**: 1574-1581.
- Sharma KG, Mason DL, Liu G, Rea PA, Bachhawat AK and Michaelis S.** 2002. Localization, regulation and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot cell.* **1**: 391-400.

- Sheehan D, Meade G, Foley VM and Dowd CA.** 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360 (Pt 1)**:1-16.
- Shin YH, Park EH, Fuchs JA and Lim CJ.** 2002. Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S- transferase from the fission yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1577**:164-170.
- Shitamukai A, Hirata D, Sonobe S and Miyakawa T.** 2004 Evidence for antagonistic regulation of cell growth by the calcineurin and high osmolarity glycerol pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**: 3651-3661.
- Sikkink R, Haddy A, MacKelvie S, Mertz P, Litwiller R and Rusnak F.**1995. Calcineurin subunit interactions: mapping the calcineurin B binding domain on calcineurin A. *Biochemistry.* **34**: 8348-8356.
- Siverio JM.** 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 277-84.
- Sorin A, Rosas G and Rao R.** 1997. *PMRI*, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **272**: 9895-9901.
- Soussi-Boudekou S, Vissers S, Urrestarazu A, Jauniaux JC and André B.** 1997. Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **23**:1157-1168.
- Springael JY and Penninckx MJ.** 2003. Nitrogen-source regulation of yeast  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nii1/Gat1 and Gzf3. *Biochem. J.* **371**:589-595.
- Stanbrough M and Magasanik B.** 1995. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**:2465-2468.
- Stankovich M, Platt A, Caddick MX, Langdon T, Shaffer PM and Arst HN.** 1993. C-terminal truncation of the transcriptional activator encoded by *areA* in *Aspergillus nidulans* results in both loss-of-function and gain-of-function phenotypes. *Mol. Microbiol.* **7**:81-87.
- Stathopoulos AM and Cyert MS.** 1997. Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Dev.* **11 (24)**: 3432-3444.
- Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ and Cyert MS.** 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes & Dev.* **13**: 798-803.
- Steinbach WJ, Cramer RA, Perfect Z Jr, B, Asfaw YG, Sauer TC, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Benjamin DK, Heitman Jr. J and Perfect JR.** 2006. Calcineurin Controls Growth, Morphology, and Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus* *Eukaryot. Cell.* **5**: 1091 - 1103.

## T

- Tan KL and Board PG.** 1996. Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT-2). *Biochem. J.* **315**: 727-732.
- 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 of yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 10113-10119.
- Tate JJ, Feller A, Dubois E and Cooper TG.** 2006. *Saccharomyces cerevisiae* Sit4 phosphatase is active irrespective of the nitrogen source provided, and Gln3 phosphorylation levels become nitrogen source-responsive in a *sit4*-deleted strain. *J. Biol. Chem.* **281**:37980-37992.



**Tate JJ and Cooper TG.** 2007. Stress-responsive Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* is separable from and can overwhelm nitrogen source regulation. 2007. *J. Biol. Chem.* **282(25)**:18476-18480.

**Taylor KL, Cheng N, Williams RW, Steven AC and Wickner RB.** 1999. Prion domain initiation of amyloid formation in vitro form native Ure2p. *Science.* **283**:1339-1343.

**Tejera P.** 2003. Aislamiento de genes implicados en la regulación /señalización de la vía de asimilación de nitrato en la levadura *Hansenula polymorpha*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna.

**Thual C, Bousset L, Komar AA, Walter S, Buchner J, Cullin C and Melki R.** 2001. Stability, folding, dimerization and assembly properties of the yeast prion Ure2p. *Biochemistry.* **40**:1764-1773.

**Todd RB, Fraser JA, Wong KH, Davis MA and Hynes M.** 2005. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryot. Cell.* **4**:1646– 1653.

**Todorova TT, Petrova VY, Vuilleumier, S and Kujumdzieva AV.** 2009. Response to different oxidants of *S. cerevisiae ure2Δ* mutant. *Arch. Microbiol.* 2009. **191**: 837-845.

**Tokes-Fuzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sumegi B, Rab A and Miseta A.** 2002. Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **44(5)**: 1299-308.

**Trópia MJ, Cardoso AS, Tisi R, Fietto LG, Fietto JL, Martegani E, Castro IM and Brandao RL.** 2006. Calcium signalling and sugar induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**: 1234-1243.

## V

**Van der Klei IJ, Hilbrands RE, Swaving GJ, Waterham HR, Vrieling EG, Titorenko VI, Cregg JM, Harder W and Veenhuis M.** 1995. The *Hansenula polymorpha* PER<sub>3</sub> gene is essential for the import of PTS<sub>1</sub> proteins into the peroxisomal matrix. *J. Biol. Chem.* **270**:17229-17236.

**Veal EA, Toone WM, Jones N and Morgan BA.** 2002. Distinct Roles for Glutathione S-Transferases in the Oxidative Stress Response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277 (38)**:35523-35531.

**Viladewall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barcelo A and Ariño J.** 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**: 43614-43624.

## W

**Wadskog I and Lennart A.** 2003. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. *Top. Curr. Genet.* **1**: 201-239.

**Wada H, Hasegawa K, Morimoto T, Kakita T, Yanazume T, Abe M and Sasayama S.** 2002. Calcineurin GATA-6 pathway is involved in smooth muscle specific transcription. *J. Cell Biol.* **156**: 983-991.

**Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF and Reed JC.** Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 284: 339.

**Watanabe Y, Perrino BA, Chang BH and Soderling TR.** 1995. Identification in the calcineurin A subunit of the domain that binds the regulatory B subunit. *J. Biol. Chem.* **270**: 456-460.

**Wickner RB, Masison DC and Edskes HK.** 1995. [PSI] and [URE3] as yeast prions. *Yeast.* **11(16)**: 1671-1685.

**Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H and Rudolph HK.** 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.

**Withee JL, Mulholland J, Jeng R and Cyert MS.** 1997. An essential role of the yeast pheromone-induced Ca<sup>2+</sup> signal is to activate calcineurin. *Mol. Biol. Cell.* **8**: 263-277.

**Withee JL, Sen R and Cyert MS.** 1998. Ion tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent phosphatase (calcineurin) is improved by mutations in *URE2* or *PMA1*. *Genetics.* **149**: 865-878.

**Wilkins BJ and Molkentin JD.** 2002. Calcineurin and cardiac hypertrophy. Where have we seen? Where are we going? *J. Physiol.* **541**: 1-8.

**Wong KH, Hynes MJ, Todd RB and Davis MA.** 2007. Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor *MeaB* reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **66**: 534-551.

**Wong KH, Hynes MJ and Davis MA.** 2008. Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryot. Cell.* **7**:917-925.

**Wullschleger S, Loewith R, Oppliger W and Hall MN.** 2005. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J. Biol. Chem.* **280**: 30697-30704.

**Wullschleger S, Loewith R and Hall MN.** 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* **124**: 471-484.

## X

**Xiao X, Fu YH and Marzluf GA.** 1995. The negative-acting NMR regulatory protein of *Neurospora crassa* binds to and inhibits the DNA-binding activity of the positive-acting nitrogen regulatory protein NIT2. *Biochemistry.* **34(27)**: 8861-8868.

## Y

**Ye T, Elbing K and Hohmann S.** 2008. The pathway by which the yeast protein kinase Sfn1 controls the acquisition of sodium tolerance is different from that mediating glucose regulation. *Microbiology.* **154**: 2814-2826.

**Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, and Cyert MS.** 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 31079-31088.

## Z

**Zhang N-N, Dudgeon DD, Paliwal S, Levchenko A, Grote E and Cunningham KW.** 2006. Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol. Biol. Cell.* **17**: 3409-3422.

**Zhang Z-R, Bai M, Wang X-Y, Zhou JM and Perret S.** 2008. "Restoration" of glutathione transferase activity by single-site mutation of the yeast prion protein *Ure2*. *J. Mol. Biol.* **384**: 641-651.

**Zhang Z-R and Perret S.** 2009. Novel glutaredoxin activity of the yeast prion protein *Ure2* reveals a native-like dimer within fibrils. *J. Biol. Chem.* **284**: 14058-14067.

**Zhao C, Jung US, Garrett-Engle P, Roe T, Cyert MS and Levin DE.** 1998. Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell. Biol.* **18**:1013-1022.