

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/43
I.S.B.N.: 978-84-15287-77-3

ELISA CABRERA AFONSO

**Caracterización de los transportadores
de nitrato y de potasio en la levadura
*Hansenula polymorpha***

Director
JOSÉ MANUEL SIVERIO EXPÓSITO



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos
BFU2004-01012/BMC (2004-2007) y BFU2007-60172/BMC (2007-2010) del
Ministerio de Ciencia e Innovación

Elisa Cabrera ha sido becaria de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y
Sociedad de la Información (ACIISI) (2006-2010) y del programa SEGAI de la
Universidad de La Laguna (2011-2012)

Summary

In this paper we characterize the first permease identified in fungi responsible for nitrate excretion to the extracellular medium, as well as the impact of this protein in the pathway of nitrate assimilation in *Hansenula polymorpha*. Likewise, we identified the kinase Npr1 participates in the regulation of K⁺ transporter, Hak1. Furthermore, the fact that levels of Hak1 not only respond to the absence of K⁺ but the presence of nitrogen sources are not preferred, it serves as a link to establish a relationship between K⁺ and nitrate transport through Ynt1. The K⁺ could be important for the stability of Ynt1 on the cell surface and thus, for the nitrate transport in *H. polymorpha*.

Finally, we show that the nitrate assimilation pathway in our yeast model is regulated at the level of NiR. This regulation is carried out by the accumulation of reduced nitrogen sources result of nitrate assimilation, so that the greater the flow of nitrate through Ynt1, the lower the levels of NiR.

Resumen

En este trabajo caracterizamos la primera permeasa identificada en hongos encargada de la excreción de nitrato al medio extracelular, así como el impacto que tiene esta proteína en la vía de asimilación de nitrato en *Hansenula polymorpha*. Así mismo, identificamos que la quinasa Npr1 participa en la regulación del transportador de K⁺, Hak1. Además, el hecho de que los niveles de Hak1 no solo respondan a la ausencia de K⁺ sino a la presencia de fuentes nitrogenadas no preferentes, nos sirve de nexo de unión para establecer una relación entre el K⁺ y el transporte de nitrato vía Ynt1. El K⁺ podría ser importante para la estabilidad de Ynt1 en la superficie celular y con ello, para el transporte de nitrato en *H. polymorpha*.

Por último, mostramos que la vía de asimilación de nitrato en nuestra levadura modelo se regula a nivel de la NiR. Esta regulación es llevada a cabo por la acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas fruto de la asimilación de nitrato, de forma que cuanto mayor sea el flujo de nitrato vía Ynt1, menores serán los niveles de NiR.

ÍNDICE DEL MANUSCRITO

Abreviaturas, símbolos y acrónimos

I. INTRODUCCIÓN, 1

II. OBJETIVOS, 37

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, 39

IV. PERSPECTIVAS, 149

V. CONCLUSIONES, 153

VI. MATERIALES Y MÉTODOS, 155

VII. BIBLIOGRAFÍA, 219

VIII. APÉNDICES, 243

ÍNDICE DETALLADO

Abreviaturas, símbolos y acrónimos

I. INTRODUCCIÓN, 1

1. La vía de asimilación de nitrato, 1

2. Transporte de macronutrientes. Nitrógeno, potasio y sulfato, 4

2.1. Transporte de nitrato en eucariotas, 4

2.1.1. Regulación del transporte de nitrato, 8

2.1.1.1. Regulación transcripcional, 8

2.1.1.2. Regulación postraducciona, 11

2.2. Sistemas de excreción de nitrato, 13

2.3. Transporte de potasio en eucariotas, 14

2.3.1. Canales de K⁺ en plantas, 16

2.3.2. Regulación del transporte de K⁺ en hongos, 17

2.3.3. Regulación del transporte de K⁺ en plantas, 18

2.4. Transporte de sulfato en eucariotas, 20

2.4.1. Asimilación de azufre, 20

2.4.2. Transporte de sulfito, 22

2.4.3. El óxido nítrico, 24

2.4.3.1. Hemoglobinas y su papel en el estrés nitrosativo, 25

3. Regulación postraducciona de los transportadores de membrana, 28

3.1. Mecanismos moleculares, 28

4. Señales y mecanismos de señalización, 34

II. OBJETIVOS, 37

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, 39

1. La permeasa de sulfito Ssu2 participa en la excreción de nitrato en *H. polymorpha*, 39

1.1. El genoma de *H. polymorpha* presenta dos genes que codifican permeasas similares a ScSSU1, 39

1.2. Ssu1 y sobre todo Ssu2 modifican el flujo de nitrato y la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato, 41

1.2.1. HpSsu1 y HpSsu2 participan en la extrusión de sulfito, 41

1.2.2. El mutante Δ ssu2 presenta un incremento en el consumo de nitrato. Ssu2 actúa como una permeasa de nitrato en *H. polymorpha*, 42

1.2.3. La expresión de los genes inducidos por nitrato aumenta en el mutante Δ ssu2, 43

- 1.2.4. La actividad nitrato reductasa no es requerida para el transporte de nitrato en *H. polymorpha*, 46
 - 1.2.5. El consumo de nitrito no se ve afectado con la interrupción de *SSU2*, 47
 - 1.3. *Ssu2* está implicado en la excreción de nitrato y no de nitrito, 49
 - 1.3.1. El mutante $\Delta ssu2$ acumula nitrato y no nitrito, 49
 - 1.3.2. *Ssu2* excreta nitrato y no nitrito en ovocitos de *Xenopus laevis*, 51
 - 1.3.3. La cepa $\Delta ynr1$ acumula nitrato en presencia de sulfito, 53
 - 1.3.4. La cepa $\Delta ssu2$ es sensible a clorato, 55
 - 1.4. El nitrito y no el nitrato inducen la expresión de *SSU2*, 56
 - 1.5. *Ssu2* es esencial para mantener el crecimiento y la viabilidad de las células en nitrato, 61
 - 1.5.1. La cepa $\Delta ssu2$ crece deficientemente en nitrato, 61
 - 1.5.2. $\Delta ssu2$ presenta una viabilidad celular reducida efecto del nitrito generado tras la reducción del nitrato, 62
 - 1.6. *ScSsu1* es capaz de excretar nitrato y nitrito en *H. polymorpha*, 64
 - 1.6.1. *ScSsu1* excreta nitrato, 64
 - 1.6.2. *ScSsu1* excreta nitrito, 66
 - 1.7. La expresión de *SSU2* está disminuida en el mutante $\Delta gat1$, 70
- DISCUSIÓN, 73
- 2. El Transporte de potasio en *H. polymorpha*. Mecanismos implicados en la regulación transcripcional y postraducciona del transportador de K^+ de alta afinidad *Hak1*, 79**
- 2.1. El genoma de *H. polymorpha* presenta dos pautas abiertas de lectura similares a *SoTrk1* y a *SoHak1*, 79
 - 2.2. La interrupción de *TRK1* y *HAK1* confiere un crecimiento reducido en medios con bajo K^+ , 82
 - 2.3. La interrupción de *TRK1* aumenta la sensibilidad de *H. polymorpha* a algunos cationes tóxicos, 85
 - 2.4. Caracterización cinética del transporte de potasio. *HpHak1* es un transportador de potasio de alta afinidad, 87
 - 2.5. La expresión de *HAK1* y no la de *TRK1* es regulada positivamente por ausencia de K^+ , 90
 - 2.6. La calcineurina participa en la regulación de *HAK1* vía *Crz1* y *Gat1*, 91
 - 2.6.1. La región promotora de *HAK1* presenta 2 putativas secuencias del tipo CDRE, 92
 - 2.6.2. El mutante $\Delta cnb1$ presenta bajos niveles de *Hak1*, 93
 - 2.6.3. La cepa $\Delta gat1$ a diferencia de $\Delta gat2$, presenta bajos niveles de expresión y de proteína *Hak1*, 94
 - 2.7. Regulación postraducciona de *Hak1*, 95
 - 2.7.1. Los niveles de *Hak1* están regulados por el K^+ , 96

- 2.7.2. Hak1 se degrada vía endocitosis y degradación vacuolar en presencia de K^+ , 96
- 2.7.3. La ligasa de ubiquitina Rsp5 está implicada en la degradación de Hak1 en presencia de K^+ , 98
- 2.7.4. La quinasa de proteínas Npr1 regula los niveles de Hak1, 101
 - 2.7.4.1. Npr1 participa en la regulación postraducciona de Hak1, 101
 - 2.7.4.2. Npr1 regula los niveles de Hak1, 102
 - 2.7.4.3. Hak1 tiene residuos susceptibles de fosforilación, 102
 - 2.7.4.4. La fosforilación de Hak1 no es regulada por Npr1, 104
- 2.8. La fosforilación de Npr1 es regulada por el K^+ , 106
- 2.9. La rapamicina aumenta la expresión de *HAK1* en presencia de K^+ , 109
- 2.10. La ausencia de K^+ afecta al transporte de nitrato de alta afinidad, 111
 - 2.10.1. La ausencia de K^+ no afecta a la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato, 112
 - 2.10.2. La ausencia de K^+ afecta negativamente el transporte de nitrato de alta afinidad, 112

DISCUSIÓN, 115

Artículo: "Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen and carbon source availability with the yeast nitrate transporter level", 123

3. Modificaciones en la entrada neta de nitrato a través de Ynt1 regulan la vía de asimilación de nitrato, 135

- 3.1. Los niveles de Yni1 y no de Ynr1 varían en función de las cepas ensayadas, 135
 - 3.2. Los niveles de Yni1 varían en función de la cantidad de Ynt1, 137
 - 3.3. Las variaciones en los niveles de Yni1 se corresponden con variaciones en la expresión de *YNI1*, 139
 - 3.4. Variaciones en el consumo de nitrato modifican los niveles de Yni1, 140
 - 3.5. La acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas reprimen la expresión de *YNI1*, 142
- DISCUSIÓN, 144

IV. PERSPECTIVAS, 149

V. CONCLUSIONES, 153

VI. MATERIALES Y MÉTODOS, 155

1. Microorganismos, medios de cultivo, condiciones de crecimiento y test de crecimiento en siembra por goteo, 155

- 1. 1. Microorganismos utilizados, 155
 - 1.1.1. Cepas bacterianas, 155
 - 1.1.2. Cepas de levaduras, 155
- 1.2. Medios y condiciones de cultivo, 155
 - 1.2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano, 156

1.2.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de levaduras, 157

1.2.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para la inducción de los genes de asimilación de nitrato en *H. polymorpha*, 158

1.3. Test de crecimiento mediante siembra por goteo, 159

2. Transformación de microorganismos, 159

2.1. Transformación de bacterias (*E. coli*), 159

2.2. Transformación de *H. polymorpha*, 161

3. Manipulación de extractos proteicos, 162

3.1. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares, 162

3.2. Ensayos de actividad nitrato reductasa y β -galactosidasa, 163

3.2.1. Obtención de extractos celulares para el ensayo de la actividad nitrato reductasa y β -galactosidasa, 163

3.2.2. Ensayo de la actividad nitrato reductasa, 164

3.2.3. Ensayo de la actividad β -galactosidasa, 164

3.2.4. Determinación de la actividad β -galactosidasa *in situ* a partir de células de levaduras permeabilizadas con cloroformo sobre filtros, 165

3.3. Obtención de extractos de proteínas totales para SDS-PAGE, 166

3.4. Obtención de extractos de proteínas de membrana para SDS-PAGE, 166

3.5. Tratamiento de los extractos proteicos con λ -proteína fosfatasa, 167

3.6. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), 167

3.7. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF, 168

3.8. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas (*immunoblot*), 169

3.9. Determinación del transporte de nitrato de alta afinidad, 170

3.10. Determinación de la velocidad de consumo de nitrato y nitrito, 172

3.11. Determinación del transporte de nitrito de alta afinidad, 172

4. Técnicas microscópicas, 173

4.1. Tinción de vacuolas con FM4-64, 173

4.2. Tinción con DAPI, 173

4.3. Tinción con el colorante vital azul tripán, 174

4.4. Observación de las células en el microscopio de epifluorescencia, 174

5. Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos, 174

5.1. Extracción de ADN plasmídico bacteriano a pequeña escala ("minipreps"), 174

5.2. Extracción de ADN total de levadura, 175

5.3. Cuantificación del ADN, 176

5.4. Precipitación de ADN, 177

- 5.5. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR, 178
 - 5.5.1. PCR a partir de ADN purificado, 178
 - 5.5.2. PCR de colonias de bacterias y levaduras, 180
- 5.6. Análisis y modificación del ADN, 180
 - 5.6.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción, 180
 - 5.6.2. Electroforesis de ADN, 181
 - 5.6.3. Construcción de moléculas de ADN recombinantes, 182
 - 5.6.3.1. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa, 183
 - 5.6.3.2. Relleno de extremos 3' no protuberantes, 183
 - 5.6.3.3. Desfosforilación de los extremos 5' de moléculas de ADN, 184
 - 5.6.3.4. Adición de desoxiadenosinas a extremos 3' romos de moléculas de ADN, 185
 - 5.6.3.5. Reacción de ligamiento de moléculas de ADN, 185
 - 5.6.3.6. Rastreo de los transformantes, 186
 - 5.6.4. Secuenciación de ADN, 186
- 5.7. Cuantificación génica mediante PCR a tiempo real, 186
 - 5.7.1. Extracción de ARN de levaduras, 186
 - 5.7.2. Síntesis del ADNc, 187
 - 5.7.3. Cuantificación relativa de la expresión génica mediante PCR a tiempo real, 187

6. Estadística y expresión de los resultados, 190

7. Metodología específica desarrollada en este trabajo, 191

- 7.1. Obtención de extractos de proteínas totales mediante tratamiento alcalino, 191
- 7.2. Determinación de nitrato y nitrito intracelular en extractos etanólicos libres de células, 191
- 7.3. Expresión de *SSU2* en ovocitos de *Xenopus laevis*, 192
 - 7.3.1. Síntesis de ARNc, 192
 - 7.3.2. Extracción y defoliculación de los ovocitos, 193
 - 7.3.3. Microinyección de ARNc, 193
 - 7.3.4. Selección de los ovocitos que expresan Ssu2-YFP, 194
 - 7.3.5. Determinación del nitrato y del nitrito en los ovocitos, 194
- 7.4. Vectores construidos en este trabajo, 194
 - 7.4.1. Interrupciones génicas, 194
 - 7.4.1.1. Interrupción de *SSUI*, 195
 - 7.4.1.1.1. Plásmido para la interrupción, 195
 - 7.4.1.1.2. Estrategia de interrupción de *SSUI*, 196
 - 7.4.1.2. Interrupción de *SSU2*, 197

- 7.4.1.2.1. Plásmido para la interrupción, 197
- 7.4.1.2.2. Estrategia de interrupción de *SSU2*, 197
- 7.4.1.3. Interrupción del gen *YNR1* con *KanMX*, 199
 - 7.4.1.3.1. Plásmido para la interrupción, 199
 - 7.4.1.3.2. Estrategia de interrupción, 200
- 7.4.2. Complementación funcional de *SSU1* y *SSU2*, 200
- 7.4.3. Fusión del promotor de *SSU2* al gen reportero *lacZ*, 202
 - 7.4.3.1. Construcción del vector pP_{SSU2}-*lacZ*, 202
 - 7.4.3.2. Estrategia de integración, 203
- 7.4.4. Expresión de *S. cerevisiae SSU1* en *H. polymorpha*, 204
 - 7.4.4.1. Construcción del vector pP_{SSU2}-ScSSU1LEU2, 204
 - 7.4.4.2. Estrategia de integración, 205
- 7.4.5. Etiquetado de *SSU2* con el epítipo HA y la proteína verde fluorescente (GFP), 206
- 7.4.6. Expresión de *SSU2* en ovocitos de *Xenopus laevis*, 208
- 7.4.7. Fusión del promotor de *HAK1* al gen *lacZ*, 209
- 7.4.8. Fusión del promotor de *TRK1* al gen *lacZ*, 210
- 7.4.9. Etiquetado de *HAK1* con el epítipo HA y con GFP, 211
- 7.4.10. Vectores portadores de otras variantes de la proteína verde fluorescente, 213
- 7.4.11. Otros plásmidos usados en este trabajo, 216
 - 7.4.11.1. pGBβ1, 216
 - 7.4.11.2. pGBβ5, 216
 - 7.4.11.3. pNRDURA3, 216
 - 7.4.11.4. pNTB21, 217
 - 7.4.11.5. pTYNTO, 217

VII. BIBLIOGRAFÍA, 219

VIII. APÉNDICES, 243

Apéndice I: Cepas de *H. polymorpha* utilizadas en este trabajo, 243

Apéndice II: Plásmidos utilizados en este trabajo, 247

Apéndice III: Cebadores utilizados en este trabajo, 250

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS:

ARNasa	ribonucleasa
BSA	albúmina de suero bovino
C _T	ciclo umbral
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiamino tetraacetato sódico
EGTA	etilenglicol tetraacetato sódico
FDA	dinucleótido de flavina y adenina
Fd	ferredoxina
GFP	proteína verde fluorescente
HA	hemaglutinina
IPTG	isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido
INR	intermediarios nitrogenados reactivos
kDa	kilodalton
K _m	constante de Michaelis-Menten
kpb	kilopar de bases
MES	ácido 2-[n-morfolino] etanosulfónico
min	minuto
MVB	complejo multivesicular
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NR	nitrato reductasa
NiR	nitrito reductasa
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ORF	pauta abierta de lectura (open reading frame)
p/v	relación peso / volumen
pb	pares de base
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RCN	represión catabólica por nitrógeno
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR a tiempo real
s	segundo
SDS	dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamida
T _m	temperatura media de fusión
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidad
Ub	ubiquitina
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen / volumen
WT	cepa silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
YPD	medio rico no selectivo para el crecimiento de levaduras
YGNH	medio sintético con amonio como fuente de nitrógeno
YGNO	medio sintético con nitrato como fuente de nitrógeno

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

1. La vía de asimilación de nitrato.

El nitrógeno es, junto con el carbono, oxígeno e hidrógeno, uno de los macroelementos que forman parte de los seres vivos, al ser un componente fundamental de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas esenciales para la vida. En su ciclo biogeoquímico pasa por varios estados de oxidación, siendo el más abundante el de dinitrógeno (N_2) que sólo unos pocos organismos pueden utilizar como fuente asimilable de nitrógeno [264]. En general, los seres vivos incorporan el nitrógeno a las biomoléculas a través de diferentes procesos. Plantas, algas, hongos filamentosos y algunas bacterias y levaduras son capaces de incorporar el nitrógeno a partir del nitrato, mediante un mecanismo de reducción de este compuesto [276].

La ruta de asimilación de nitrato está altamente conservada en los diferentes organismos capaces de utilizarlo como única fuente de nitrógeno. Básicamente consta de tres pasos secuenciales que van desde la entrada de nitrato al interior celular en contra de un gradiente electroquímico hasta la reducción de este nitrato a amonio mediante la transferencia de 8 electrones en dos reacciones consecutivas. La enzima nitrato reductasa es responsable del primer paso de reducción del nitrato a nitrito, que a continuación es reducido a amonio por la nitrito reductasa. Este amonio será utilizado para la síntesis de aminoácidos mediante la acción de la glutamato deshidrogenasa y la glutamina sintasa (Fig. 1) [180]. El NAD(P)H, proveniente fundamentalmente de la vía de las pentosas fosfato, es el donador de electrones más frecuente en estas reacciones [38]. En el caso de la nitrato reductasa de cianobacterias y la nitrito reductasa de plantas superiores, los electrones necesarios son aportados por la ferredoxina producida durante la fotosíntesis.

El uso del nitrato como fuente de nitrógeno conlleva un enorme gasto energético como consecuencia: 1) del transporte de nitrato al interior celular en contra del gradiente electroquímico; 2) la conversión del nitrógeno desde el estado de oxidación +5 al -3 y; 3) la incorporación del amonio a intermediarios del carbono [68]. Además el nitrito producido tras la primera reducción del nitrato es un compuesto tóxico y mutagénico para las células debido a su capacidad para diazotizar los grupos amino de las bases nitrogenadas [129, 130]. Por este motivo las células recurren a

complejos sistemas de regulación transcripcional y postraduccional con el fin de sincronizar la actividad de la vía a los requerimientos nutricionales de la célula y a la disponibilidad de nitrógeno.

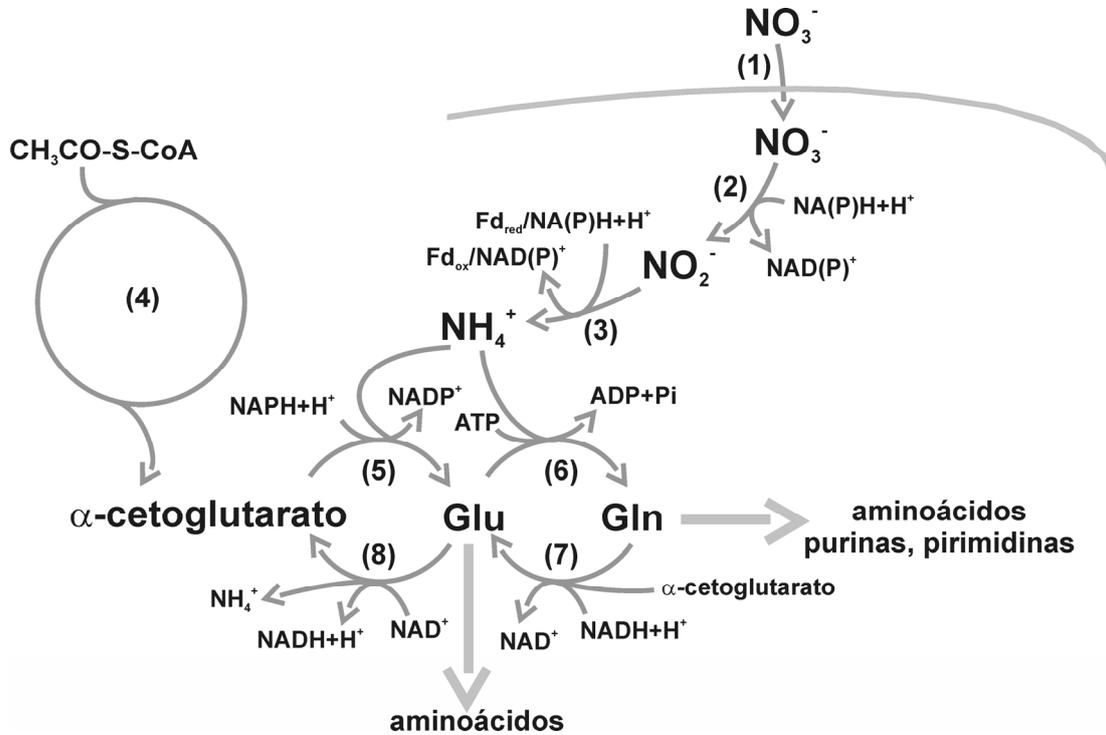


Figura 1. Vía de asimilación de nitrato. Para poder ser asimilado, el nitrato debe atravesar la membrana plasmática mediante proteínas transportadoras (1). Una vez en el interior, el nitrato es reducido a nitrito por la nitrato reductasa (2) y éste a amonio por la nitrito reductasa (3). El amonio es incorporado a esqueletos de carbono procedentes del ciclo de Krebs (4), mediante la acción de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H (5) y glutamina sintetasa (6). Glutamina (Gln) y α -cetoglutarato pueden producir glutamato (Glu) mediante la glutamato sintasa (7). El glutamato es desaminado por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (8). A partir del glutamato y de la glutamina se pueden producir el resto de aminoácidos y compuestos orgánicos nitrogenados de la célula. Adaptado de [180].

Una de las estrategias más comunes de los organismos asimiladores de nitrato es la de agrupar en el genoma a todos los genes que codifican la maquinaria necesaria para el uso del nitrato como única fuente de nitrógeno. Esta estrategia permite coordinar eficientemente la expresión y la regulación de todos los elementos. Algunos ejemplos son: el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, en el que los genes que codifican para un transportador de nitrato (*nrtA*), la nitrato reductasa (*niaD*) y la nitrito reductasa (*niiA*) se encuentran agrupados en el genoma [142] o el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*

donde se observan dos agrupamientos génicos diferentes [97, 239]. En el caso de la levadura *Hansenula polymorpha* se ha identificado un único agrupamiento de estos genes (Fig. 2) [13, 14, 33, 227].

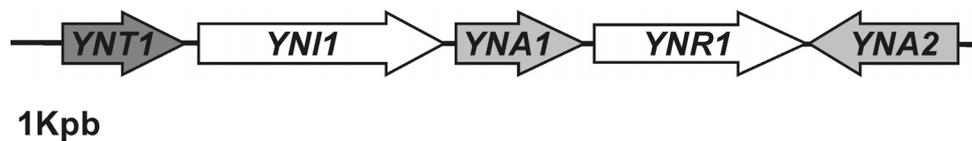


Figura 2. Agrupamiento de los genes de asimilación de nitrato de *H. polymorpha*. En una región de 11 Kpb del genoma se encuentran los genes *YNT1* (transportador de nitrato), *YNI1* (nitrito reductasa), *YNA1*, *YNR1* (nitrato reductasa) e *YNA2*, con promotores independientes y transcripción coordinada. *YNA1* e *YNA2* codifican para dos factores transcripcionales.

El estudio de la vía de asimilación de nitrato ha cobrado gran relevancia, principalmente como consecuencia de su importancia en la nutrición de las plantas y la trascendencia de éstas en la alimentación humana. El aumento exponencial de la población y, por tanto, de la demanda de alimentos, ha colocado a la producción agrícola en una situación difícilmente sostenible sin la aplicación de abonos nitrogenados, siendo el nitrato el principal fertilizante utilizado. A la vista de esta situación es de especial interés el poder mejorar el rendimiento de la vía, con el fin de mantener o incluso mejorar los rendimientos agrícolas disminuyendo significativamente el uso de fertilizantes. En este sentido, se estima que la sobrefertilización ha provocado que se doble la tasa anual de entrada de nitrógeno en el ciclo. Esta situación conlleva una serie de importantes efectos negativos tales como: liberación de óxido nitroso y óxido nítrico a la atmósfera, contribuyendo al efecto invernadero, disminución de la capa de ozono y lluvia ácida [47]. Además, dado que el nitrato tiene carga neta negativa actúa como un ión capaz de secuestrar minerales alcalinos como calcio, magnesio y potasio, nutrientes básicos para las plantas, lo que conlleva a una disminución de la fertilidad de los suelos. Los elevados niveles de nitrato en lagos, ríos y aguas subterráneas, provoca episodios de eutrofización en la desembocadura de los ríos causando anoxia (ausencia de oxígeno) o hipoxia (bajos contenidos de oxígeno) [47]. Ambas condiciones se traducen en la muerte, de manera significativa, de peces y crustáceos. Además, elevadas concentraciones de nitrato en las aguas para el consumo humano significan un riesgo para la salud. La flora bucal e intestinal puede convertir el nitrato en nitrito. Cuando el nitrito pasa al torrente sanguíneo, convierte a la hemoglobina en una forma incapaz de fijar el oxígeno molecular (metahemoglobina)

[149]. El nitrito también puede reaccionar con sustancias que se encuentran de forma natural en los alimentos, dando lugar a nitrosaminas y nitrosamidas que son potenciales carcinógenos [235].

Por lo tanto, se hace necesario un mejor conocimiento de esta vía metabólica, principalmente en lo referente a su regulación y su respuesta a las condiciones del medio, para poder aportar soluciones a estos graves problemas.

2. Transporte de macronutrientes: nitrógeno, potasio y azufre.

El nitrógeno junto con el potasio y el azufre forman parte de los nutrientes esenciales para los seres vivos y muchos de ellos se encuentran en concentraciones limitantes.

2.1. Transporte de nitrato en eucariotas.

La entrada de nitrato al interior celular es el primer paso de la vía de asimilación. Las características fisicoquímicas de este anión hacen que sólo pueda atravesar la membrana plasmática a través de proteínas transportadoras. En los organismos capaces de asimilar nitrato se han aislado numerosos tipos de transportadores tanto exclusivos para el nitrato como capaces de transportar otros sustratos además de nitrato. La clasificación de estas proteínas transportadoras se realiza en base a múltiples criterios, como: características cinéticas, especificidad por sustrato o patrón de expresión. En la mayor parte de estos organismos el transporte de nitrato no es llevado a cabo por un solo tipo de transportador. Generalmente se observa una gran variedad de sistemas de transporte con el objetivo principal de asegurar el transporte de nitrato en un amplio rango de condiciones ambientales. Algunos casos representativos son los del alga verde *C. reinhardtii* con tres familias de sistemas de transporte de nitrato o nitrito diferentes (NRT1, NRT2 y NAR1) [88, 89, 97] o la planta *Arabidopsis thaliana* con varios sistemas de transporte de nitrato [203]. En los últimos años el número de transportadores identificados ha aumentado considerablemente como consecuencia de los proyectos de secuenciación genómica. Sin embargo, las características funcionales y estructurales de la mayoría de estos sistemas de transporte se desconocen.

El transporte de nitrato, incluso cuando sus concentraciones extracelulares están en el rango milimolar, se realiza en contra de un gradiente electroquímico [68].

Esto implica el consumo de energía por parte de los sistemas de transporte. De manera general esta energía es proporcionada por el gradiente de protones de la membrana plasmática, el cual es dependiente de la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana [84]. Un caso excepcional es el de la fanerógama marina *Zostera marina* en la que el transporte de nitrato está acoplado al gradiente de sodio y no al de protones [103, 255]. Estudios electrofisiológicos del transportador de nitrato NrtA de *Aspergillus nidulans* o del transportador de *Candida utilis* muestran una estequiometría para el transporte de nitrato de $2H^+:1NO_3^-$ [84, 325].

Una primera clasificación de estos transportadores se ha realizado en base a sus características cinéticas, más concretamente, en función de las K_m determinadas. Esto permite agrupar a los sistemas de transporte acorde a su afinidad por el sustrato [89, 91, 97]. En primer lugar, nos encontramos con aquellos sistemas de transporte con alta afinidad por el sustrato (HANTS) con una K_m en el rango micromolar (inferior a $0.8 \mu M$) y que se encuentran en plantas, algas, levaduras y hongos filamentosos. En el otro extremo se agrupan aquellos transportadores con baja afinidad por el nitrato (LANTS), en el rango milimolar ($K_m > 1 \text{ mM}$), que se han encontrado en plantas, algas y levaduras. Generalmente en los organismos coexisten ambos sistemas de transporte. Esto hace que la importancia relativa de cada uno varíe en función de los niveles de nitrato en el medio. Algunos autores consideran la existencia de un tercer grupo de transportadores dentro de esta clasificación, son aquellos transportadores con una cinética bifásica en respuesta a las condiciones del medio. Este es el caso del transportador AtNRT1.1 (CHL1) que se caracteriza por poseer una K_m de $\sim 50 \mu M$ cuando los niveles de nitrato en el medio son bajos; mientras que en presencia de altos niveles de este anión los valores de su K_m aumentan hasta el rango milimolar [168, 169]. Junto con este criterio de clasificación estos transportadores también se pueden agrupar en función de su patrón de expresión. En este sentido, podemos referirnos a transportadores de alta afinidad constitutivos (cHANTS) o inducibles (iHANTS) y a transportadores de baja afinidad constitutivos (cLANTS) o inducibles (iLANTS). Los iHANTS normalmente tienen una afinidad menor por el nitrato que los cHANTS, aunque su capacidad de transporte es mayor que la de los segundos, por lo que suelen ser los responsables de prácticamente todo el transporte de nitrato del medio cuando este se encuentra en concentraciones micromolares (Tabla 1).

El análisis y comparación de las secuencias de los distintos transportadores de nitrato aislados hasta el momento ha permitido agruparlos en dos familias génicas claramente diferenciadas. Por un lado, la familia NNP (*N*itrate *N*itrite *P*orter), que está constituida por transportadores de nitrato y nitrito de procariotas y de eucariotas [91]. Constituyen una de las 17 familias que se agrupan en la Superfamilia Mayor de Facilitadores (MFS) [222]. Dentro de este grupo de transportadores de nitrato se incluyen los transportadores de *A. nidulans* (NrtA y NrtB), los transportadores de plantas del tipo Nrt2, Ynt1 de *H. polymorpha* y Nrt2 de *Tuber borchii* [91, 187, 205, 212, 213]. En todos los casos son transportadores funcionalmente muy similares, con unos valores de K_m para el nitrato en el rango μM . Los transportadores agrupados en la MFS son un grupo bastante heterogéneo en el que se incluyen transportadores de diferentes tipos de sustratos. A nivel estructural son muy similares, con doce dominios transmembranales y extremos amino y carboxilo terminales citosólicos. Otra característica interesante es la existencia de un dominio central citosólico de tamaño variable entre los dominios transmembranales VI y VII.

Tabla 1: Clasificación de los transportadores de nitrato en base a sus características cinéticas, fisiológicas y a la similitud de secuencia.

Clasificación en base a las características fisiológicas y cinéticas.

	Afinidad por el sustrato	Patrón de expresión	Ejemplos
iHANTs	Alta	Inducibles	AtNRT2.1, Ynt1, TbNrt2
cHANTs	Alta	Constitutivos	Chl8
iLANTs	Baja	Inducibles	CrNRT2;3, AtNRT1.1
cLANTs	Baja	Constitutivos	AtNRT1.2

Clasificación en base a la similitud de secuencia

	Familia	Distribución
NRT1	POT	Plantas
NRT2	NNP	Hongos filamentosos y levaduras. Algas y plantas superiores.

Un segundo grupo de transportadores de nitrato está englobado en la familia PTR o POT, en la que se agrupan principalmente cotransportadores H^+ /oligopéptidos ampliamente distribuidos en procariotas y eucariotas [294] (Tabla 1). A los

transportadores de nitrato de esta familia se les denomina NRT1 y en ella se incluye exclusivamente a transportadores de plantas como AtNRT1.1 y BrNRT1.2. Se ha propuesto que la familia NRT1 incluye a los LANTs y la familia NRT2 a los HANTs, aunque esta generalización se encuentra con excepciones como las de AtNRT1.1, que tiene propiedades de HANT y LANT y CrNRT2.3 de *C. reinhardtii*, que se trata de un LANT [214]. Los transportadores de la familia NRT1 identificados hasta el momento muestran la capacidad de transportar otros compuestos junto con el nitrato. Así, en el caso del transportador de *Brassica napus*, BrNRT1.2, se ha determinado su capacidad para transportar con igual eficacia L-histidina y nitrato [324]. Para AtNRT1.1, el estudio de mutantes de *A. thaliana* resistentes a clorato puso de manifiesto el transporte de clorato por parte de este transportador [295]. En los transportadores de la familia NRT2 el transporte de clorato no está completamente demostrado; así en el caso de NrtA de *A. nidulans*, aunque la ausencia del transportador originaba resistencia a clorato en el hongo [37], los datos electrofisiológicos sugieren que era el clorito el sustrato de este transportador [325].

Algunos sistemas de transporte de nitrato de alta afinidad poseen un mecanismo más complejo con la participación de varias proteínas. La primera evidencia a este respecto se obtuvo del alga *C. reinhardtii*, donde el producto del gen *NAR2* es necesario para el transporte de nitrato de alta afinidad a través de los transportadores CrNRT2.1 y CrNRT2.2 [100, 238, 323]. Posteriormente, se ha descrito una situación similar para algunos transportadores de alta afinidad de plantas superiores como es el caso de *Hordeum vulgare* [292] o *A. thaliana* [218]. Trabajos recientes muestran la necesidad de una interacción de ambas proteínas (AtNar2.1 y AtNrt2.1) para la localización de AtNrt2 en la superficie celular [221].

Muchos de los transportadores de nitrato de la familia *NRT2* son capaces de transportar nitrato y nitrito con alta afinidad, siendo el transporte de nitrito inhibido por la presencia de nitrato en el medio. La única excepción conocida hasta el momento es CrNRT2.3 que tiene baja afinidad para el nitrato y alta para el nitrito [245]. El único transportador exclusivo de nitrito de eucariotas es el denominado como *NARI*, presente en la membrana de los cloroplastos de *C. reinhardtii* [99, 244]. Este transportador tiene alta homología con los transportadores de nitrito de bacterias y se encuentra agrupado junto al resto de genes implicados en la asimilación de nitrato en esta alga. En *H. polymorpha* también se sugiere la existencia de un sistema de transporte de nitrito de

alta afinidad independiente del nitrato que se une al transporte biespecífico por parte de Ynt1 [177]. Las características de esta proteína se desconocen.

2.1.1. Regulación del transporte de nitrato.

El elevado coste energético que supone para la célula la utilización del nitrato como fuente de nitrógeno hace que su asimilación se encuentre desfavorecida en relación con la de otros compuestos nitrogenados más reducidos. En este sentido, las células usan principalmente las denominadas fuentes de nitrógeno ricas o preferentes, entre las que se incluyen glutamina o asparagina [69, 180]. La presencia de este tipo de compuestos tiene un efecto negativo sobre la asimilación de aquellas fuentes de nitrógeno no preferentes o pobres, como el nitrato, la prolina o la urea, cuya utilización supone un mayor gasto energético para la célula. Las células intervienen impidiendo la asimilación de estas fuentes pobres actuando sobre la expresión de los genes, pero también a nivel postraduccional sobre los puntos claves de cada ruta. En este sentido, el doble carácter del nitrato, tanto de sustrato de la vía de asimilación, como de inductor de los genes de la misma, hace que el control de sus niveles intracelulares sea uno de los principales puntos de control de esta ruta metabólica. Por este motivo, la célula recurre a diversos mecanismos de regulación del transporte de nitrato, con el objetivo final de adecuar la respuesta a las condiciones del medio con la mayor velocidad posible.

2.1.1.1. Regulación transcripcional.

La regulación transcripcional de los transportadores de nitrato es compartida con el resto de elementos de la vía, de manera que la regulación de la transcripción de los genes de la vía de asimilación de nitrato se realiza de manera coordinada. Dos señales diferentes son requeridas para la expresión de estos genes: en primer lugar, es necesaria una señal de desrepresión que es compartida para todas las rutas de asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas y, en segundo lugar, una señal inductora originada por el nitrato. El primer componente de este conjunto de señales necesarias para la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato, la desrepresión, está sometido a la Represión Catabólica por Nitrógeno (RCN). La RCN está mediada por múltiples mecanismos moleculares que actúan coordinadamente sobre la transcripción de todas las rutas de asimilación de fuentes de nitrógeno no preferentes. Su acción se basa en impedir la expresión de los genes relacionados con la utilización de este tipo de fuentes de nitrógeno en presencia de fuentes de nitrógeno ricas, mediante la

participación de unos factores GATA y proteínas que interaccionan con estos [61, 68, 180].

Aunque la RCN es un fenómeno presente en todos los organismos, existen marcadas diferencias en los elementos y rutas de señalización implicados. Así, en los hongos filamentosos *Neurospora crassa* y *A. nidulans*, la desrepresión se lleva a cabo por los factores transcripcionales de tipo GATA, *NIT2* y *AREA*, respectivamente [93, 190]. Los factores tipo GATA son un conjunto de factores transcripcionales muy conservados en los organismos y que se caracterizan por su unión a una secuencia de ADN (A/T)GATA(A/G), presente en la región promotora de los genes regulados por estos factores [200]. La ausencia de fuentes preferentes causa la unión de estos factores a los promotores de genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas activando su expresión [55, 56, 157]. El control de la acción de estos factores transcripcionales tiene lugar a diferentes niveles. En primer lugar su transcripción esta también sometida a RCN. En el caso de *AREA*, existe una regulación autógena como consecuencia de la presencia de sitios GATA en su promotor [160]. La estabilidad del ARNm para este gen también es regulada por la presencia de fuentes de nitrógeno a través de la región 3' del mensajero [233, 289]. Por último, se han identificado otras proteínas que actúan impidiendo la interacción de estos factores GATA con la región promotora, las denominadas NMR y NMRA, que se unen a *NIT2* y *AREA* respectivamente [6, 313]. La ausencia de estas proteínas permite la unión de estos factores transcripcionales con el ADN en cualquier situación, lo que provoca una desrepresión constitutiva [160, 283]. Sin lugar a dudas el organismo en el que más se han estudiado los elementos implicados en la RCN es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que no asimila nitrato pero si otras fuentes de nitrógeno no preferentes. En este caso, la complejidad de este sistema de regulación transcripcional es aún mayor, debido a la presencia de factores GATA positivos y negativos que compiten por las mismas regiones de ADN [60, 61, 282]. En esta levadura se han identificado cuatro factores transcripcionales de este tipo implicados en el mecanismo de RCN, son los denominados: Gat1, Gln3, Dal80 y Deh1. Los dos primeros son factores positivos que al unirse a las regiones promotoras de los genes favorecen su expresión. Curiosamente, también aumentan la expresión de los factores transcripcionales negativos que compiten con ellos por la unión al ADN. A su vez, algunos de estos factores se regulan de manera autógena. Este complejo mecanismo permite una respuesta adecuada no solo en rapidez

sino también en intensidad, con el fin de modular adecuadamente la expresión de estos genes. Por lo tanto, la desrepresión de los genes sometidos a RCN va a depender de la unión de los factores positivos Gat1 y Gln3 a las regiones promotoras [61]. La proteína Ure2 participa en otro de los mecanismos de control de este proceso, impidiendo la interacción de estos factores GATA positivos con el ADN. Para este propósito se une a estos factores en el citoplasma impidiendo su entrada al núcleo [23, 61, 67]. No está claro el mecanismo implicado en la unión entre ambas proteínas, aunque si se ha observado que tiene lugar exclusivamente en presencia de fuentes preferentes de nitrógeno [158]. En condiciones opuestas, los factores GATA son liberados pasando al núcleo donde activan la transcripción. El tratamiento con rapamicina ha puesto en evidencia la participación de la ruta de las quinasas TOR en la regulación de la RCN [23]. La rapamicina es un macrólido lipofílico aislado inicialmente de *Streptomyces hygroscopicus* con actividades antifúngicas, inmunosupresoras y anticancerígenas. En el interior celular, es capaz de unirse a una prolil-isomerasa de 12 kDa, FKBP, formando un complejo que inhibe a las quinasas Tor1 y Tor2 [71]. Ambas quinasas son reguladoras centrales en multitud de procesos celulares y su perturbación tiene efectos pleiotrópicos [71, 138, 321]. Una de las funciones de esta ruta de señalización celular es el control transcripcional del metabolismo del nitrógeno a través de la RCN. La inactivación de ambas quinasas en presencia de fuentes de nitrógeno pobres o de rapamicina causa la desrepresión de los genes sometidos a RCN [61, 71]. La participación de esta ruta de señalización a este nivel se realiza a través del control de la localización celular de Gln3 [23].

Trabajos de nuestro grupo han permitido identificar los elementos implicados en la RCN de *H. polymorpha* y su relación con la vía de asimilación de nitrato. En este sentido, se propone la existencia de 3 factores transcripcionales positivos, Gln3, Gat1 y Gat2, y un factor transcripcional negativo o represor, Gzf3. Salvo Gln3, todos ellos se regulan autógenamente y entre si [195]. También se ha identificado y caracterizado a HpUre2, una proteína similar a ScUre2, implicada no solo en RCN sino en tolerancia a sales y en la homeostasis del Ca^{2+} [247]. El tratamiento con rapamicina en esta levadura permite la desrepresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato en presencia de fuentes de nitrógeno favorables [211]. No obstante, el efecto de este macrólido y la ruta de señalización TOR sobre el metabolismo del nitrato en otros organismos no están tan claros. En *A. thaliana* [197] o en el alga verde *C. reinhardtii* [70] se han aislado los

genes correspondientes a la única quinasa TOR de estos organismos, sin observarse ningún efecto a nivel de la transcripción de los genes de la vía de asimilación de nitrato.

El conocimiento sobre el otro componente necesario para la expresión de los genes de esta vía metabólica, es decir, aquel necesario para la inducción de estos genes por nitrato, es aun más limitado. Los principales datos se han obtenido de los estudios con hongos filamentosos. En *N. crassa* y en *A. nidulans* la señal de inducción esta mediada por los factores transcripcionales Nit4 y NirA, respectivamente [40, 41, 320]. Se trata de factores transcripcionales del tipo GAL4 con un dominio de unión al ADN en dedo de zinc del tipo $Zn(II)_2Cys_6$. Se ha observado que la función de activación de estos factores transcripcionales requiere de su unión con los factores tipo GATA, *NIT2* y AREA y de su localización celular [26, 189]. NirA se localiza en el citoplasma en ausencia de nitrato y se acumula en el núcleo en presencia del mismo, activando así la expresión de los genes inducidos por nitrato. La permanencia de NirA en el núcleo es posible porque presumiblemente el nitrato bloquea la interacción de NirA con la maquinaria implicada en la exportación nuclear, más concretamente a nivel del factor KapK [27].

En *H. polymorpha*, se han descrito dos factores transcripcionales *YNA1* [14] e *YNA2* [13] del tipo $Zn(II)_2Cys_6$, necesarios para la inducción de los genes implicados en la asimilación de nitrato [276].

Por el contrario, en el alga *C. reinhardtii* se ha identificado un único factor transcripcional implicado en regular positivamente los genes requeridos para la asimilación de nitrato [45, 97]. Se trata de una proteína estructuralmente relacionada con otros factores de plantas, pero no con los factores transcripcionales NirA/Nit4/Yna de hongos y levaduras. En presencia de nitrato se une específicamente al promotor de *NIA1* modulando su expresión [45].

2.1.1.2. Regulación postraduccional.

Junto con el control de la expresión de los transportadores de nitrato, las células poseen mecanismos para actuar sobre el propio transportador. Esta regulación postraduccional permite una respuesta más rápida que la obtenida exclusivamente con el control transcripcional. A pesar de la gran importancia de este sistema de regulación, el conocimiento del mismo solo se ha puesto en evidencia recientemente. En *Nicotiana*

plumbaginifolia, la expresión constitutiva del transportador de nitrato de alta afinidad, mostró que existía un descenso del transporte de nitrato en presencia de amonio en el medio. En estas condiciones, los niveles de ARNm permanecían constantes. Esto sugería que el amonio o algún compuesto derivado de éste, regulaba negativamente el transporte de nitrato a nivel postraducciona [92].

El transportador de nitrato de *A. thaliana* AtNRT1.1 también está sometido a regulación postraducciona en función de las condiciones del medio. En este caso, las modificaciones en los niveles extracelulares de nitrato causan un cambio de afinidad mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación del residuo de treonina 101. En presencia de bajas concentraciones de nitrato (en el rango μM) el transportador se fosforila en la treonina 101. Esta fosforilación acarrea el aumento de la afinidad del transportador por el nitrato. En la situación opuesta, cuando los niveles de nitrato son elevados, el transportador se encuentra desfosforilado, presentando una K_m muy superior. Este mecanismo permite un rápido ajuste del transporte de nitrato a través de este transportador en función de las condiciones del medio [169]. Además trabajos de nuestro grupo donde se demuestra que CHL1 es capaz de restablecer el transporte de nitrato en el mutante $\Delta ynt1$, sugieren además que la fosforilación del residuo Thr101 podría estar implicada en la llegada a membrana de este transportador [186]. No obstante, CHL1 es más que un simple transportador, es un sensor de nitrato independientemente de su capacidad para transportar nitrato, y esta capacidad está regulada por fosforilación dependiente de CIPK23 (“Calcineurin B-like (CBL)-interacting protein kinase”) [134].

Otros trabajos realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto la existencia de mecanismos de regulación postraducciona del único transportador de nitrato de alta afinidad de *H. polymorpha*, Ynt1. Esta regulación esta mediada por la fuente de nitrógeno del medio. En presencia de fuentes preferentes de nitrógeno, como amonio o glutamina y en ausencia de glucosa [187], Ynt1 es ubiquitinado en los residuos de lisina Lys-253 y Lys-270, modificación que produce la endocitosis y degradación vacuolar de Ynt1 [212]. Por el contrario, cuando las células son sometidas a ayuno de nitrógeno, Ynt1 es fosforilado. Esta fosforilación es necesaria para la llegada de Ynt1 a la superficie celular. Formas no fosforiladas de Ynt1 (tienen sustituidas las serinas 244 y 246 por alaninas) son ubiquitinadas y dirigidas a la vacuola para su degradación desde la ruta biosintética [213]. La quinasa de proteínas Npr1 juega un

papel muy importante en la fosforilación de Ynt1, regulando así los niveles de Ynt1 en función de las fuentes nitrogenadas y su llegada a la membrana plasmática [187].

Recientemente han ido apareciendo trabajos en los que se describen la existencia de mecanismos de regulación postraduccional para transportadores de nitrato en diversos organismos. Este es el caso del transportador AtNRT2.1 de *A. thaliana* que parece responder de manera similar que Ynt1 a la presencia de fuentes de nitrógeno preferentes [310]. Para el transportador de *A. nidulans*, NrtA, se sugiere la existencia de un mecanismo de inactivación postraduccional del transportador para evitar un exceso de entrada de nitrato [307].

2.2. Sistemas de excreción de nitrato.

La asimilación de nitrato hacia formas reducidas del mismo es un balance entre la cantidad de nitrato transportado al interior celular y la cantidad de nitrato excretado. Sin embargo, muy poco se conoce de las entidades moleculares implicadas. En plantas se sabe que la excreción de nitrato incrementa al aumentar la concentración intracelular de nitrato [176] y se regula por mecanismos diferentes a los que modulan el transporte de nitrato, pues mientras la excreción de nitrato es estimulada por amonio [10, 11], el consumo de nitrato es inhibido [163]. Determinadas condiciones de estrés producen un aumento en la excreción de nitrato en plantas [12]. De hecho, en *A. thaliana* se ha identificado la primera proteína implicada en la excreción de nitrato. NAXT1 (“*Nitrate Excretion Transporter1*”) es un miembro de las siete proteínas NAXT identificadas en *A. thaliana*, que pertenecen a la familia de transportadores de nitrato y péptidos (NRT1/PTR) [268]. NAXT1 se expresa en el córtex de las raíces adultas y lleva a cabo el transporte pasivo de nitrato al exterior celular cuando las células son sometidas a estrés ácido. Además de NAXT1, una de las siete proteínas NAXT es capaz de excretar nitrato en fragmentos de membrana plasmática aislada de plantas que crecen en condiciones normales, aunque su capacidad de excreción es menor que NAXT1 [268]. También en *Arabidopsis* se ha identificado la proteína AtClCa implicada en la homeostasis del nitrato. Pertenece a la familia de los canales de cloro CLC que se localiza en la membrana vacuolar y mediante un intercambio NO_3^-/H^+ es capaz de acumular nitrato en la vacuola [75].

En hongos aunque se considera la existencia de los sistemas de excreción de nitrato [307], hasta el momento no se ha identificado ninguno. Se piensa que los

sistemas de excreción de nitrato son los responsables de que cuando la nitrato reductasa está interrumpida, no se detecte transporte neto de nitrato [297, 307]. De hecho, esta hipótesis queda demostrada con los resultados que se muestran en el capítulo 1, donde caracterizamos la primera permeasa de nitrato identificada en hongos.

2.3. Transporte de potasio en eucariotas.

El potasio es un elemento esencial para las células ya que los niveles intracelulares de este catión regulan diversos parámetros fisiológicos como: turgor, potencial de membrana, fuerza iónica o pH intracelular [207]. Es por ello que para hacer frente a los requerimientos intracelulares de K^+ , los organismos han desarrollado diferentes sistemas de transporte. Así, han sido identificados dos tipos de transportadores de K^+ en bacterias, hongos y plantas, no presentes en células animales denominados: 1) TRK/KTR/HKT (acrónimo de “*Transport of K^+* ” en hongos y bacterias, “ *K^+ transporter*” en bacterias e “*High-affinity K^+ transporter*” en plantas); y, 2) HAK/KUP/KT (acrónimo de “*High-affinity K^+ uptake*” en hongos y plantas, “ *K^+ uptake*” en bacterias y “ *K^+ transporter*” en plantas). En plantas, además se han caracterizado varios canales de K^+ implicados tanto en la entrada como en la salida de este catión [114].

Los transportadores de K^+ pertenecientes al grupo TRK-HKT (Fig. 3) fueron identificados por primera vez en levaduras en *S. cerevisiae* [95, 148], este hecho hizo posible la identificación de estos sistemas de transporte en otros hongos (*Schwanniomyces occidentalis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *N. crassa* y *Debaryomyces hansenii*) y en plantas. El transporte de K^+ en *S. cerevisiae* es llevado a cabo por dos tipos de transportadores TRK, *TRK1* y *TRK2*. El papel de *Trk1* parece ser predominante sobre *Trk2*, ya que el mutante $\Delta trk1$ pierde la capacidad de crecer en medios con baja concentración de K^+ [95, 148]. Sin embargo, parece que *Trk2* es capaz de sustituir las funciones llevadas a cabo por *Trk1* pero bajo determinadas condiciones [201]. *Trk1* está implicado además, en controlar el potencial de membrana. En *S. pombe*, el transporte de potasio también depende de dos transportadores del tipo TRK [44, 280]. Tanto *Trk1* como *Trk2* son capaces de hacer frente a los requerimientos de K^+ de forma individual, solamente el doble mutante presenta deficiencias de crecimiento en condiciones limitantes de K^+ [43]. Aunque bajo condiciones de estrés salino, *Trk1*

parece ser más eficiente en el mantenimiento de la integridad de la levadura que Trk2, pues el mutante *trk2* (con Trk1 funcional) es menos sensible a Li^+ e higromicina B [43].

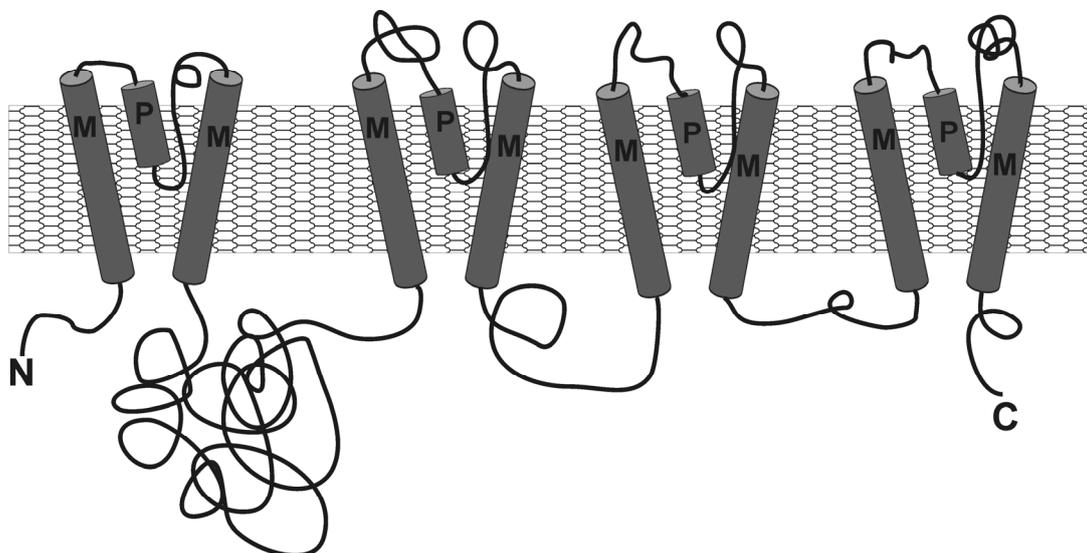


Figura 3. Representación esquemática de transportadores TRK-HKT según la estructura MPM de los dominios transmembranales. La parte superior se corresponde al medio extracelular. Adaptado de [83].

Los transportadores TRK de *S. occidentalis*, *N. crassa* y *D. hansenii* comparten similitud de secuencia y de función con los transportadores TRK de *S. cerevisiae* y *S. pombe*. En el caso de *S. occidentalis*, se ha propuesto que Trk1 juega un importante papel en el control del potencial de membrana y opera cuando las concentraciones de K^+ no son limitantes [20] al igual que le ocurre a NcTrk1 [121, 249] y DhTrk1 [188, 237].

Las plantas también presentan una clase de transportador de K^+ del tipo TRK, en este caso denominada HKT, y es una de las cinco familias de sistemas de transporte que poseen implicadas en el transporte de este catión. No obstante, parecen jugar un papel más importante en el transporte de Na^+ que de K^+ [248, 262]. De hecho, AtHKT1 solo es capaz de transportar Na^+ cuando se expresa en ovocitos de *Xenopus laevis* [191].

Desde siempre se ha intentado contestar si estos transportadores son capaces de transportar K^+ y Na^+ . Existen evidencias indirectas de la participación de NcTrk1 y ScTrk1 en el transporte de Na^+ , pues la presencia de Na^+ es capaz de bloquear el transporte de K^+ [120, 121], aunque no existen evidencias directas de ello. Gracias a la identificación y posterior caracterización electrofisiológica del transportador Trk1 del hongo endosimbionte *Hebeloma cylindrosporum* en ovocitos de *Xenopus laevis*, se comprobó que es un sistema permeable a Na^+ y K^+ [63].

La presencia de estos transportadores TRK es típica de organismos que viven en ambientes donde las concentraciones de potasio son regularmente altas, no sufren oscilaciones importantes. En cambio, aquellos organismos que viven en hábitats donde las concentraciones de potasio son muy limitantes, como les ocurre a algunos hongos y a plantas, presentan otro tipo de transportador de potasio mejor adaptado a éstos ambientes. Se trata de los transportadores HAK (*High Affinity K⁺*) los cuales operan a concentraciones bajas de K⁺ y pH. A diferencia de los transportadores TRK, éstos no suelen participar en el control del potencial de membrana [20]. Estos transportadores están relacionados estructuralmente con los sistemas Kup de bacterias. El primer transportador de este tipo aislado en eucariotas fue el clonado en la levadura *S. occidentalis*, capaz de vivir en ambientes muy pobres desde el punto de vista nutricional [19]. SoHak1 se caracteriza por tener una función diferente a SoTrk1. Hak1 presenta una gran capacidad y afinidad para transportar K⁺ en condiciones limitantes de este catión y a pH ácidos, mientras que Trk1 predomina a concentraciones altas de K⁺ y de pH, además de controlar el potencial de membrana [20]. En *N. crassa* y *D. hansenii*, Trk1 es el transportador predominante y Hak1 solamente se expresa en condiciones de déficit de K⁺ [121, 188, 237, 249].

En plantas, los transportadores del tipo HAK se han identificado desde algas verdes hasta angiospermas, evidenciando la gran relevancia que tienen para su supervivencia en hábitats deficitarios de K⁺ [114]. Se identificaron por primera vez en *A. thaliana* y en *Hordeum vulgare* [240, 260]. Algunos de estos transportadores son capaces de transportar Na⁺, como es el caso de HvHak1 [260]. Se ha mostrado que las sustituciones en los residuos V366I y R591C de HvHak1 le confiere un aumento del transporte de K⁺ y una menor sensibilidad a Na⁺, Li⁺ e higromicina B [181].

En *S. occidentalis*, *N. crassa* y en *D. hansenii* al igual que en plantas, convergen estos dos sistemas de captación de K⁺. Esto hace que la organización del transporte de K⁺ sea diferente a *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Los transportadores HAK se expresan especialmente en condiciones de déficit de K⁺ y presentan una baja K_m , lo que le permite adaptarse a medios pobres en este catión.

2.3.1. Canales de K⁺ en plantas.

Los canales de K⁺ constituyen una amplia familia de sistemas de transporte de K⁺ presentes probablemente en la mayoría de las plantas, participando en importantes

funciones fisiológicas. Al principio se les atribuyó un papel secundario en el transporte de K^+ , pero ahora se conoce que participan en el transporte de K^+ de alta afinidad [133]. Los primeros canales de K^+ clonados en plantas (*A. thaliana*), *KATI* [5, 263] y *AKT1* [272], se identificaron por su capacidad de complementar funcionalmente las deficiencias de K^+ del mutante $\Delta trk1$ de *S. cerevisiae*. *KATI* presenta una alta permeabilidad para el K^+ , media para el Rb^+ y baja para el Cs^+ , Na^+ y Li^+ [263]. *AKT1* también contribuye al transporte de K^+ de alta afinidad [262]. La identificación de estos canales permitió el clonaje de otros muchos con diferentes localizaciones y por tanto, funciones en las plantas. Así, por ejemplo, *AtAKT3* [184] es un canal de K^+ que se localiza en el floema y se bloquea por concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} .

Este tipo de canales no han sido identificados en hongos hasta el momento. No obstante, se presupone su existencia, pues el doble mutante de *S. cerevisiae* $\Delta trk1\Delta trk2$ mantiene todavía un transporte de K^+ de baja afinidad.

2.3.2. Regulación del transporte de K^+ en hongos.

El transporte de K^+ debe de estar regulado de manera muy precisa ya que las concentraciones intracelulares de este catión, como ya hemos mencionado, participan en importantes funciones celulares.

En relación a la regulación de los dos transportadores de K^+ descritos en *S. cerevisiae*, *TRK1* y *TRK2*, no se han encontrado modificaciones de los niveles de expresión de estos genes en respuesta a las concentraciones de K^+ o a estrés salino [9]. Los mecanismos de regulación postraduccionales son escasamente conocidos. Existen varios trabajos que apuntan a mecanismos de fosforilación/desfosforilación como los implicados en regular a Trk1. Si se conoce que las quinasas de proteínas Hal4 y Hal5 modulan positivamente a Trk1 [207]. Estas quinasas son requeridas para estabilizarlo en la superficie celular bajo condiciones de déficit de K^+ , previniendo su endocitosis y degradación vacuolar [228]. Sin embargo, se desconoce como estas quinasas regulan a Trk1 pues hasta ahora no se ha podido demostrar que participen en su fosforilación. Si se ha encontrado que Trk1 se fosforila y que la sobreexpresión de *HAL5* aumenta la fosforilación de Trk1 *in vitro*, aunque también produce un incremento en la fosforilación de otras proteínas como Pma1 [319].

Por otro lado, se le ha atribuido a la fosfatasa Ppz1 y a su modulador negativo Hal3 un papel en la regulación de la actividad de Trk1. Ppz1 y Ppz2 son proteínas fosfatasas de serinas y treoninas que participan en la tolerancia a sales [234]. Hal3 es la subunidad reguladora de Ppz1, encargada de regular de forma negativa a esta fosfatasa [59]. El par Ppz1/Hal3 está implicado en regular la concentración intracelular de K^+ y el pH a través de Trk1 [318, 319]. Se ha observado que los niveles de fosforilación *in vitro* de Trk1 aumentan en el doble mutante $\Delta ppz1\Delta ppz2$ pero no se ve afectada la estabilidad y/o localización celular de Trk1 [251]. Los autores sugieren que Trk1 presenta alta afinidad por el K^+ cuando está fosforilado y Ppz1 disminuye los niveles de fosforilación de Trk1 cuando las concentraciones de K^+ son altas. Este mecanismo parece ser dependiente del pH, de forma que la interacción de Ppz1/Hal3 podría actuar como un sensor del pH intracelular que modula el transporte de H^+ y de K^+ regulando la actividad de Trk1. No obstante, hasta ahora no se ha podido probar que Ppz1 desfosforile a Trk1 de manera directa. En este sentido, se ha identificado otra fosfatasa, la calcineurina, pero con efecto positivo sobre Trk1. La calcineurina es una fosfatasa necesaria para la regulación de la estabilidad y actividad de Trk1, regulando los niveles de *HAL5* [50, 198].

Muy poco se conoce sobre la regulación de los transportadores de potasio del tipo HAK. Como su propio nombre indica son transportadores de K^+ de alta afinidad presentes en organismos adaptados a vivir en ambientes donde las concentraciones de este catión sufren variaciones muy drásticas. Debido a ello, la expresión de *HAK1* responde a las concentraciones de K^+ presentes en el medio, induciéndose su expresión cuando la cantidad de K^+ es muy baja y reprimiéndose cuando aumenta su concentración. Este es el caso de *NcHAK1* [121], *SoHAK1* [20] y *DhHAK1* [187]. Además la expresión de *DhHAK1* requiere no solo de la ausencia de K^+ sino de Na^+ , pues el Na^+ es capaz de suplir la ausencia de K^+ y reprimir la expresión de *HAK1* [188].

2.3.3. Regulación del transporte de K^+ en plantas.

El transporte de K^+ en plantas es mediado por 3 sistemas de transporte: HKT, HAK y canales de K^+ , los cuales presentan distintas localizaciones y funciones dentro de la planta. Esto hace que la regulación del transporte de K^+ sea muy compleja. Así, por ejemplo, en *Arabidopsis* se han llegado a identificar un total de 71 transportadores y canales [53].

Los mecanismos de regulación transcripcional que afectan a los transportadores y canales están influenciados por el estadio de desarrollo de la planta y por estímulos ambientales. De esta forma, la expresión de muchos de los miembros de la subfamilia de transportadores *AtCHX* en *Arabidopsis* se inducen durante la gametogénesis masculina [288]. En cambio, los transportadores del tipo KUP/HAK/KT, como *AtKUP3* y *AtHAK5* de *Arabidopsis* [3, 107, 147], *HAK1* de *H. vulgare*, *OsHAK1* de *Oriza sativa* [21] y *LeHAK5* de *Solanum lycopersicum* [216] se inducen preferentemente por déficit de K^+ . Aunque su regulación puede ser más compleja, pues la expresión de *LeHAK5* no solamente depende de las concentraciones de K^+ , sino de otras condiciones, como el potencial de membrana, de forma que un aumento del potencial de membrana está relacionado con un aumento de expresión de *LeHAK5* [216]. También se ha observado que un déficit de hierro y de fosforo inorgánico aumenta los niveles de *LeHAK5* [306]. En cuanto a los canales de K^+ , parece que su expresión no depende de las concentraciones de K^+ , sino de algunas hormonas [53, 54, 232].

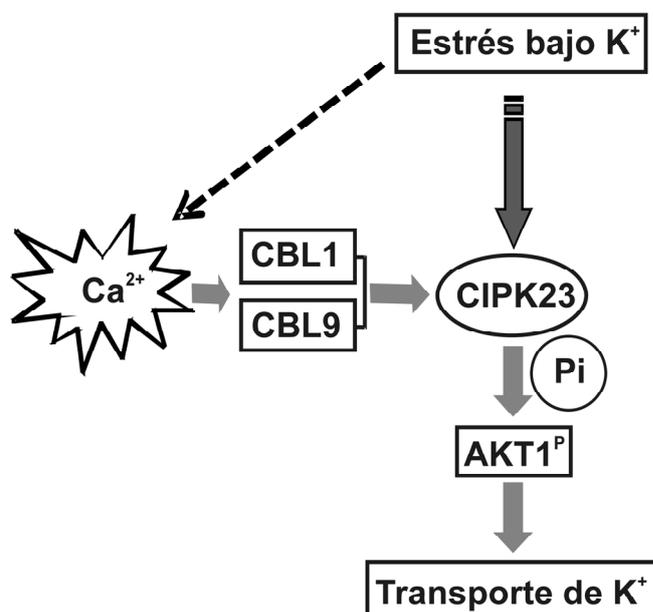


Figura 4. Representación esquemática de la regulación de AKT1 mediada por las proteínas CBL1 y CBL9 ("Calcineurin B-like protein") y por la quinasa CIPK23. Adaptado de [314].

Dentro de los mecanismos de regulación postraduccional, destacan los procesos de fosforilación/desfosforilación como un mecanismo universal de regulación de los transportadores y canales en plantas. Un estudio reciente revela que la

fosforilación directa del canal *AtAKT1* por parte de la quinasa de proteínas CIPK23 activa el transporte de K^+ . La activación de CIPK23 es dependiente de las proteínas CBL1 y CBL9 (“*Calcineurin B-like protein*”). Los autores proponen que bajo un estrés provocado por déficit de K^+ se produce un aumento intracelular y transitorio de Ca^{2+} que activaría a las proteínas CBL1 y CBL9, localizadas en la membrana plasmática. Estas proteínas interaccionarían con la quinasa CIPK23 reclutándola a la membrana plasmática donde fosforilaría a *AKT1* activando así el transporte de K^+ (Fig. 4) [314]. Por otro lado, el canal de K^+ *AtAKT2* es regulado por desfosforilación. Análisis electrofisiológicos demuestran que el transporte mediado por Akt2 es inhibido prácticamente en su totalidad por la fosfatasa AtPP2CA [54].

2.4. Transporte de sulfato en eucariotas.

El azufre es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. En los organismos vivos, el azufre es un nutriente esencial con muchas funciones. Se puede encontrar en formas reducidas en aminoácidos, péptidos y proteínas, en clusters de Fe-S, en diferentes cofactores (como en el cofactor de molibdeno, MoCo) y en forma oxidada, en grupos sulfonatos modificando proteínas, polisacáridos y lípidos [153]. Además otros compuestos reducidos del azufre, como el H_2S (ácido sulfhídrico), sirven como donantes de electrones para un gran número de bacterias y archeas quimiolitotrofas y fototrofas [293].

Las plantas, algas, levaduras y muchos microorganismos heterótrofos, asimilan el azufre en forma de sulfato. Para poder ser incorporado como radical sulfhidrilo a la cisteína, metionina y a algunas coenzimas, el sulfato debe reducirse a sulfuro mediante la reducción asimilatoria del sulfato. Su absorción directa como sulfuro no es posible para la mayoría de los microorganismos, debido a la elevada toxicidad del H_2S . En la reducción asimiladora del sulfato, se evita su toxicidad con la reacción inmediata del azufre reducido con un aceptor, como es la serina, para formar cisteína [154].

2.4.1. Asimilación de azufre.

La mayor fuente de azufre en plantas es el sulfato inorgánico, aunque son capaces de usar otros compuestos reducidos del azufre [164]. El sulfato es incorporado al interior celular a través de transportadores de sulfato. Las plantas poseen múltiples transportadores de dicho anión con distintas propiedades y funciones [39]. *Arabidopsis*

cuenta con 14 genes que codifican para transportadores de sulfato divididos en 5 grupos según su similitud de secuencia y función (*SULTR1-SULTR5*). Los transportadores de sulfato de alta afinidad, grupo 1, son responsables del transporte de sulfato del suelo al interior celular [275]. Recientemente se ha demostrado que uno de los transportadores de este grupo, más concretamente el transportador SHST1 de *Stylosanthes hamata* [276], está implicado además en el transporte de molibdato [90]. Los transportadores de baja afinidad, grupo 2, son requeridos para la translocación del sulfato dentro de la planta. Los transportadores del grupo 4, se localizan en el tonoplasto y son responsables del flujo de sulfato en la vacuola [144]. Se conoce muy poco acerca de la función de los transportadores de sulfato del grupo 3 y 5, salvo que aumentan la tasa de translocación de sulfato en el interior de la planta [145], aunque también se ha identificado un transportador de molibdato dentro del grupo 5 [291].

El sulfato es posteriormente metabolizado a una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios. La asimilación del sulfato en forma de cisteína comienza con su transporte al interior de los plastos donde es activado por adenilación, formándose adenosina 5' fosfosulfato (APS), reacción catalizada por la ATP sulforilasa (ATPS). El APS es reducido a sulfito por la APS reductasa. El sulfito generado es rápidamente reducido a sulfuro por la sulfito reductasa (SiR), y éste último es incorporado al esqueleto carbonado de *O*-acetilserina (OAS) para formar cisteína (Fig. 5). La *O*-acetilserina se sintetiza a partir de serina y acetil-coenzima A mediante la acción de la serina acetil-transferasa (SAT), mientras que la síntesis de cisteína es catalizada por una OAS (tiol) liasa (OASTL) [74, 154, 164]. El APS generado también puede ser fosforilado por una APS quinasa (APK) formando 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), el cual es un donador de grupos sulfato muy importante en reacciones del metabolismo secundario [206].

La cisteína puede entonces ser directamente incorporada a péptidos o proteínas como la glutatona, la cual desempeña múltiples funciones en plantas, entre las que se encuentra servir de almacén y transporte de formas reducidas del azufre. Alternativamente, la cisteína puede ser metabolizada y servir como donante de grupos sulfhidrilos (-SH) para la síntesis de metionina, clusters de Fe-S, coenzimas, y otros metabolitos secundarios [154]. Asimismo, el sulfito generado también puede ser utilizado para formar sulfolípidos, componentes esenciales de las membranas de los cloroplastos [259].

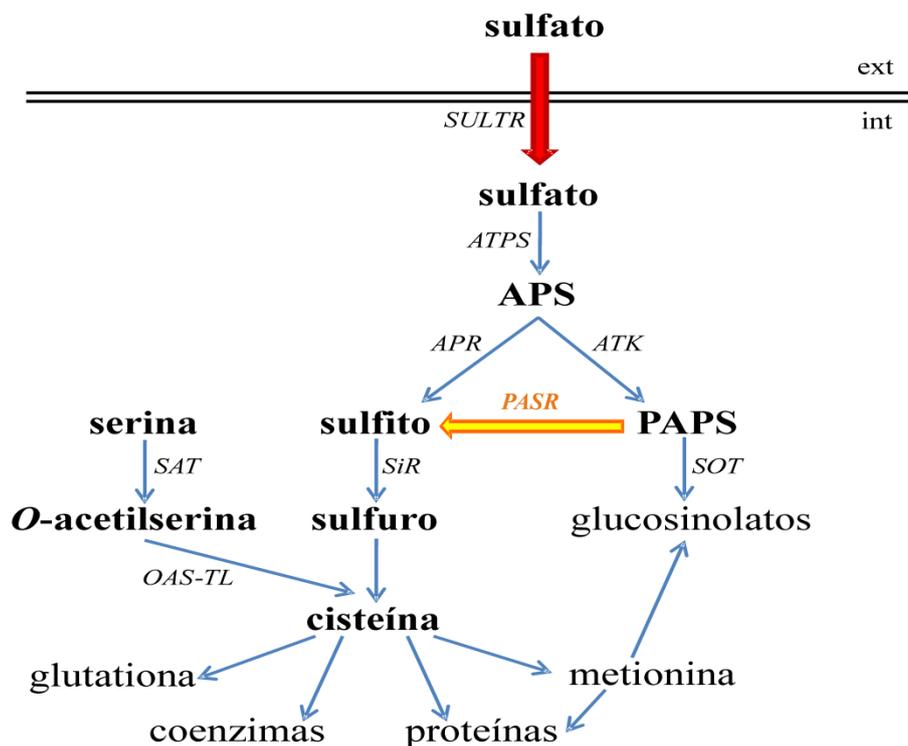


Figura 5. Esquema de la asimilación de sulfato en plantas. APS (adenosina 5' fosfosulfato), ATPS (ATP sulforilasa), APR (APS reductasa), ATK (APS quinasa), SOT (sulfotransferasa), SiR (sulfito reductasa), SAT (serina acetil-transferasa), OAS-TL (O-acetilserina liasa). PASR (PASP reductasa). De color naranja se representa el paso adicional que ocurre en bacterias y hongos [309]. Adaptado de [74].

La principal fuente de azufre en bacterias y levaduras es el sulfato, aunque pueden utilizar otros compuestos reducidos. Al igual que ocurre en plantas, el sulfato es activado por adenilación, en una reacción catalizada por la ATP sulforilasa. A diferencia de lo que ocurre en plantas donde el sustrato inicial para la reducción es el APS, en estos organismos, el APS es sometido a otra fosforilación para formar PAPS (3' fosfoadenosina 5-fosfosulfato), a través de la APS quinasa. El PAPS producido es reducido posteriormente por la PAPS reductasa generando sulfito, el cual sufre otra reducción sucesiva para incorporarse más tarde como grupo sulfhidrilo a la cisteína (Fig. 5) [309].

2.4.2. Transporte de sulfito.

El sulfito aunque es un metabolito intermediario que se genera durante la reducción asimiladora del sulfato, es un potente tóxico para las células. El sulfito es muy utilizado para la conservación de alimentos, vinos y productos farmacéuticos, gracias a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes [290]. El sulfito causa un descenso de la cantidad de ATP inactivando las enzimas gliceraldehido-3-fosfato

deshidrogenasa y la alcohol dehidrogenasa [131, 236, 265]. Hasta el momento no se conoce como el sulfito es incorporado al interior celular. Existe bastante controversia en relación a este tema. En plantas se sabe que es capaz de entrar al interior celular a través de los estomas [231]. En levaduras, en cambio, unos autores proponen que el sulfito es transportado por simple difusión a través de la bicapa lipídica [94, 130, 285] y otros afirman la existencia de algún transportador en la membrana plasmática, hasta ahora sin identificar, responsable del transporte de sulfito [178].

Las levaduras han desarrollado varios mecanismos que le confieren tolerancia a este compuesto. Una manera importante de protección es su transformación a formas no-tóxicas, como es el acetaldehído [51]. Una de las formas más eficientes de detoxificación es la existencia de la permeasa de sulfito, Ssu1 (“*Sensitive to Sulfito*”), identificada por primera vez en *S. cerevisiae* [17]. ScSSUI fue aislado por su capacidad de complementar mutaciones que causaban sensibilidad a sulfito [315]. Su estructura sugiere que es un miembro de la MFS (*Major Facilitator Superfamily*) implicado en la salida de compuestos tóxicos [225]. El extremo carboxilo terminal de Ssu1, de unos 49 aminoácidos, es hidrofílico y tiene unos 10 residuos de serina, sitios putativos de fosforilación [16, 18]. Cepas portadoras de multicopias de SSUI presentan una mayor resistencia a sulfito que una cepa WT, además de un fenotipo de resistencia a selenito, indicando que también podría participar en la excreción de este compuesto. La inducción de SSUI bajo compuestos como el MMS (metilmetanosulfonato) podría indicar su participación en la detoxificación de agentes alquilantes [225]. La inducción de este gen por óxido nítrico sugiere que además de excretar sulfito, excrete algún tipo de intermediarios nitrogenados reactivos (INR) o incluso el propio nitrato procedente de la reducción del NO por parte de las hemoglobinas [261].

La expresión de SSUI requiere de la presencia del factor transcripcional FZF1 [17]. FZF1 codifica un factor de transcripción muy similar a TFIIIA [36], que contiene 5 dedos de zinc del tipo Cys₂-His₂, tres de los cuales se encuentran en tándem en el extremo N-terminal, mientras que el cuarto y el quinto se encuentran separados por unos 60 aminoácidos. Su delección confiere sensibilidad a sulfito y su sobreexpresión en una cepa carente del gen SSUI sigue manteniendo el fenotipo de sensibilidad al mismo [16, 18]. Fzf1 es necesario no solo para la expresión de SSUI, sino también de ScYHB1 (flavohemoglobina de *S. cerevisiae*). Un aumento de la expresión de Fzf1 causa una

mejora en el crecimiento en medios conteniendo agentes generadores de óxido nítrico. Es posible que bien el NO o los INR activen a Fzf1. Así puede que la nitrosilación de Fzf1 cause su activación [261].

Ssu1 también ha sido identificado en *Candida albicans*. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae* su mutación también confiere sensibilidad a sulfito. La expresión de CaSsu1 depende en parte del factor transcripcional no homólogo a ScFzf1, *CTA4*. Este factor transcripcional es necesario para iniciar los mecanismos de defensa contra el NO generado por el organismo huésped, responsable de la inducción del gen que codifica para la flavohemoglobina CaYhb1, principal mecanismo de defensa contra el NO que posee *C. albicans* [57].

También se han caracterizado varias proteínas ortólogas a ScSsu1 en y en hongos dermatofitos. Más concretamente en los hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* y en *Arthroderma benhamiae* (TruSSU1 y AbeSSU1, respectivamente), responsables de muchas de las micosis que afectan al hombre. Estos hongos necesitan la presencia de estos transportadores para excretar sulfito, el cual es usado como agente reductor durante la degradación de la queratina. Así, los transportadores de sulfito podrían ser una nueva diana para el desarrollo de fármacos antifúngicos. La alta expresión de TruSSU1 y AbeSSU1 en comparación con Ssu1 de *Aspergillus fumigatus*, refleja la importancia que tienen estas permeasas de sulfito en el desarrollo de la patogenicidad por parte de estos hongos dermatofitos [162].

2.4.3. El óxido nítrico.

El óxido nítrico es un gas incoloro y poco soluble en agua presente en pequeñas cantidades en los organismos. Está también extendido por el aire siendo producido en automóviles y plantas de energía. Se le considera un agente tóxico. A altas concentraciones resulta tóxico para las células y es usado como mecanismo de defensa frente a patógenos. Sin embargo, a bajas concentraciones, actúa como segundo mensajero en la regulación del flujo sanguíneo y la señalización entre células nerviosas en mamíferos [209]. En plantas juega un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de la misma [136].

El óxido nítrico se produce a partir de la arginina por medio de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) [87]. En plantas, en algunos hongos y en el alga *C. reinhardtii*, el

óxido nítrico es sintetizado por la nitrato reductasa mediante la reducción del nitrito [246, 257, 266]. De esta forma el uso de compuestos que inhiban la nitrato reductasa (como el clorato) provocan una disminución del NO producido. La formación de NO también disminuye con bajas concentraciones de nitrato [246].

Tanto el óxido nítrico como los INR reaccionan con diferentes componentes celulares causando daños en el ADN, en proteínas y lípidos. Así, es bien conocido, que el NO regula la actividad de varias enzimas al interactuar con clusters Fe-S y con grupos hemo, entre otros. Por ejemplo, el NO se une reversiblemente al Cu^{2+} del citocromo *c* oxidasa (Cox) inhibiendo la respiración celular [49]. Los organismos han desarrollado varias estrategias para combatir los efectos adversos del óxido nítrico creando mecanismos de detoxificación, reparando los daños causados y modulando su producción. Dentro de las estrategias desarrolladas para la detoxificación de este compuesto destacan las hemoglobinas, familia de proteínas presentes en un amplio rango de organismos, incluyendo vertebrados, invertebrados, plantas superiores, hongos y bacterias [136].

2.4.3.1. Hemoglobinas y su papel en el estrés nitrosativo.

Las hemoglobinas, genéricamente, se definen como una superfamilia de proteínas con un grupo hemo altamente conservado, que unen oxígeno reversiblemente. Las diferencias entre los distintos organismos se establece en el dominio globina (parte proteica) tanto en estructura como en complejidad [322]. No obstante, estas diferencias son menores en las hemoglobinas de vertebrados, pues la mioglobina y la hemoglobina son muy parecidas estructuralmente y funcionalmente. Aunque la función de las hemoglobinas de vertebrados es el transporte de oxígeno, la función principal de las hemoglobinas en otros grupos de organismos es la protección frente al estrés nitrosativo producido por NO [105, 204].

Las hemoglobinas de invertebrados, bacterias, hongos y plantas son más variables. Las hemoglobinas bacterianas y fúngicas se pueden agrupar en 2 categorías generales: i), **hemoproteínas diméricas** compuestas por dos cadenas polipeptídicas con un grupo hemo cada una de ellas; ii), **flavohemoproteínas monoméricas** formadas por una cadena polipeptídica con un grupo hemo y un dominio de unión al FAD. Al primer grupo pertenece la hemoglobina de la bacteria *Vitreoscilla* (VGB), que comparte cierta similitud de secuencia con las leghemoglobinas de plantas [322]. El segundo tipo de

hemoglobinas se encuentra, por ejemplo, en las bacterias *Escherichia coli* y *Alcaligenes eutrophus*, y en las levaduras *C. albicans*, *C. norvensis*, y *S. cerevisiae* [136] en el hongo *A. nidulans* [266]. La región N-terminal de estas proteínas alberga el grupo hemo y es similar a VGB y a las leghemoglobinas de plantas, y en la región C-terminal tienen el dominio de unión al FAD [322].

En plantas, por el contrario, existen 3 grupos diferentes de hemoglobinas: simbióticas, no simbióticas y truncadas [79]. Las **hemoglobinas simbióticas** o **leghemoglobinas** se encuentran en plantas que viven en simbiosis con microorganismos, como por ejemplo ocurre en las asociaciones simbióticas que se dan entre plantas de leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*, donde la hemoglobina está constituida por un grupo hemo, sintetizado por la bacteria, y una parte proteica, codificada por los genes de la planta. Participan en transporte de oxígeno a la planta. Las **hemoglobinas no simbióticas (Hbs-ns)** son ubicuas en el reino vegetal y se expresan en gran variedad de tejidos vegetales. Dentro de este tipo de hemoglobinas, existe una clase de Hbs-ns (clase-1) que presentan una alta afinidad por el oxígeno y su expresión se induce por hipoxia, estrés osmótico, tratamientos con nitrato, nitrito, NO, ácido salicílico y H₂O₂; y por deficiencias en hierro, fósforo y potasio [143]. El último grupo lo forman las **hemoglobinas truncadas** que al igual que las anteriores, están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, aunque también se encuentran en cianobacterias y en protozoos [79] Poseen un tamaño inferior al resto de las hemoglobinas y se piensa que podrían participar en el metabolismo del NO [42].

Las hemoglobinas protegen de la toxicidad generada por el NO metabolizándolo, desarrollando para ello: a) una actividad **NO dioxygenasa** que convierte el NO en nitrato bajo condiciones aeróbicas; y, b) una actividad **NO reductasa** que reduce el NO a óxido nítrico en condiciones anaeróbicas, según las ecuaciones que se recogen a continuación en la figura 6 [124].

Cabe destacar que la principal forma de eliminación del NO es su transformación a nitrato por medio de una actividad NODs, pues no todos los microorganismos desarrollan una actividad óxido nítrico reductasa para la detoxificación de dicho elemento [124].

Dentro de las flavohemoglobinas es importante señalar la hemoglobina de *E. coli*, la denominada Hmp. Fue la primera flavohemoglobina en ser clonada y secuenciada [301]. Se trata de una proteína codificada por un gen inducible tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas, pero especialmente por nitrato, nitrito y por NO. Hmp presenta tanto una actividad NODs como NORs para el consumo del NO [62].

Condiciones aeróbicas



Condiciones anaeróbicas



Figura 6. Reacciones catalizadas por las hemoglobinas. Se representa la actividad NODs (NO dioxigenasa) que genera nitrato en condiciones aeróbicas y la actividad NORs (NO reductasa) que en ambientes anaeróbicos produce óxido nítrico. Adaptado de [124].

En hongos además de las flavohemoglobinas de *C. albicans*, *S. cerevisiae* y de *A. fumigatus*, encontramos la flavohemoglobina FhbA de *A. nidulans*. Ésta última es importante para la detoxificación del NO producido durante la asimilación de nitrato y evitar la inhibición que produce el óxido nítrico en la NR y la NiR (Fig. 7) [266].

En plantas son muchas las hemoglobinas no simbióticas que han sido aisladas en los últimos años. Así tenemos como ejemplo, *ORYsa GLB1a* y *ORYsa GLB1b*, 2 genes que codifican Hbs-ns de la clase1 en plantas de *Oryza sativa*. Estos genes son inducidos por nitrato, nitrito y por compuestos generadores de NO, por lo que se cree que su función es proteger a la planta de ciertos metabolitos tóxicos producidos durante la asimilación de nitrato. Además en los mutantes del gen de la nitrato reductasa no existe expresión de estos genes aun en presencia de nitrito, lo que indica que su expresión está asociada a la presencia de dicha enzima [217].

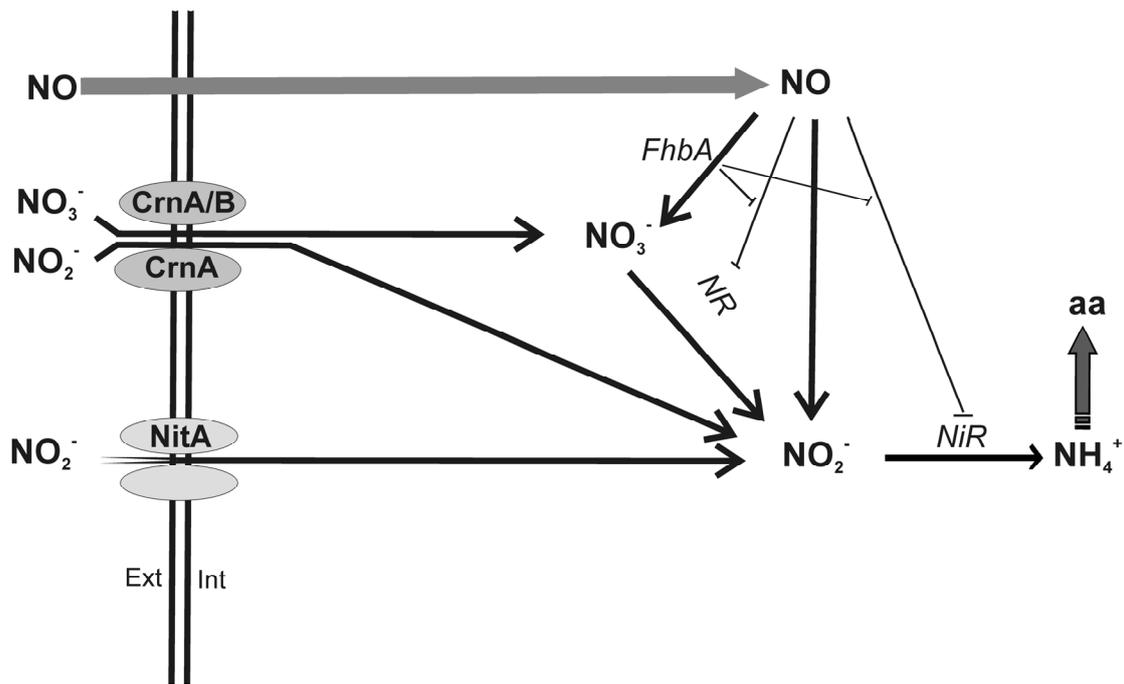


Figura 7. Representación esquemática de la interacción entre la ruta de asimilación de nitrato y la vía de detoxificación del NO en *A. nidulans*. El NO_3^- y el NO_2^- son incorporados al interior celular a través de transportadores presentes en la membrana plasmática, mientras que el NO atraviesa la membrana por simple difusión. El NO_3^- es reducido a NO_2^- por la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) reduce el NO_2^- a NH_4^+ . Posteriormente el NH_4^+ pasa a formar parte del pool de aminoácidos. El NO es oxidado principalmente a NO_3^- por acción de la flavohemoglobina (FhbA). Espontáneamente el NO se puede oxidar a NO_2^- . Esta reacción es reversible a bajo pH (lumen vacuolar). Además el NO_3^- y el NO_2^- producidos a partir del NO pueden ser sustratos de la NR y NiR. Los elevados niveles intracelulares de NO inhiben parcialmente la actividad de la NR y NiR. Por ello la flavohemoglobina es importante para mantener las actividades de estas enzimas. Adaptado de [266].

3. Regulación postraduccional de los transportadores de membrana.

3.1. Mecanismos moleculares.

En levaduras, principalmente en *S. cerevisiae* [141], se han identificado y caracterizado un alto número de transportadores de membrana. Algunos de estos transportadores son constitutivos y su presencia es fundamental en todas las condiciones de crecimiento; sin embargo, constituyen una pequeña proporción de todos los transportadores de las células. En este sentido, aquellos transportadores cuya participación y presencia durante el crecimiento celular es dependiente de la existencia de determinados nutrientes o de condiciones específicas son, sin lugar a dudas, los más abundantes. Estos transportadores inducibles están sometidos a complejos procesos de regulación tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Este último tipo de regulación tiene lugar como respuesta a distintos factores y se basa en la acción de múltiples mecanismos sobre la proteína con el fin de controlar su actividad y

estabilidad. Esta acción directa sobre la proteína supone una respuesta mucho más inmediata que la modulación de la expresión génica. Por este motivo la mayor parte de los transportadores de membrana, especialmente aquellos que transportan nutrientes, están sometidos a esta regulación para controlar los niveles de este nutriente en la célula y con ello la expresión de genes dependientes de su presencia [118].

Una característica importante de este tipo de transportadores de membrana plasmática es su necesaria localización en la superficie celular para realizar su actividad. Esta dependencia es la base de la regulación del transporte de nutrientes actuando sobre la localización de estas proteínas en respuesta a distintas condiciones. La llegada a la superficie celular de los transportadores implica todo un complejo proceso de tráfico intracelular que va desde la expresión de la proteína, el paso de esta desde el retículo endoplasmático al Golgi, y de ahí a la superficie celular [274]. La maquinaria celular puede actuar a distintos niveles con el fin de controlar la cantidad de transportador presente en la superficie celular. En este sentido, puede promover la internalización de las moléculas ubicadas en la membrana plasmática [118, 150] o impedir la llegada de las mismas a la superficie celular. En este caso las proteínas son enviadas directamente desde la ruta de secreción a la vacuola para su degradación sin paso previo por la membrana plasmática (Fig. 8).

Los mecanismos moleculares que participan en el control de la distribución celular de estos transportadores son múltiples, implicando en numerosas ocasiones modificaciones postraduccionales de estas proteínas. En *S. cerevisiae*, el número de transportadores para los que se ha determinado su glicosilación y la importancia de ésta son reducidos. Algunos ejemplos de transportadores glicosilados incluyen a: el transportador de amonio Mep2 [183], el transportador endosomal Nhx1 [308] o el transportador de cobre Ctr1 [73]. Una modificación común en los transportadores es la fosforilación en residuos de serina. Estos son los casos de la H⁺-ATPasa de membrana Pma1 [52], la permeasa de uracilo Fur4 [302] o el transportador de a-factor Ste6 [156]. La fosforilación del extremo carboxilo terminal de Pma1 es necesaria para la activación de la proteína. Para otros transportadores se sugiere que su fosforilación es uno de los mecanismos de control de los niveles de endocitosis y localización de la proteína [281]. En el caso de Ynt1 la fosforilación en las serinas 244 y 246 dependiente de la quinasa Npr1, es necesaria para la llegada a membrana de este transportador [213]. En otros casos la fosforilación es un paso previo y necesario para la ubiquitinación y posterior

endocitosis del transportador, este es el caso del transportador de fosfato de alta afinidad Pho84 [175].

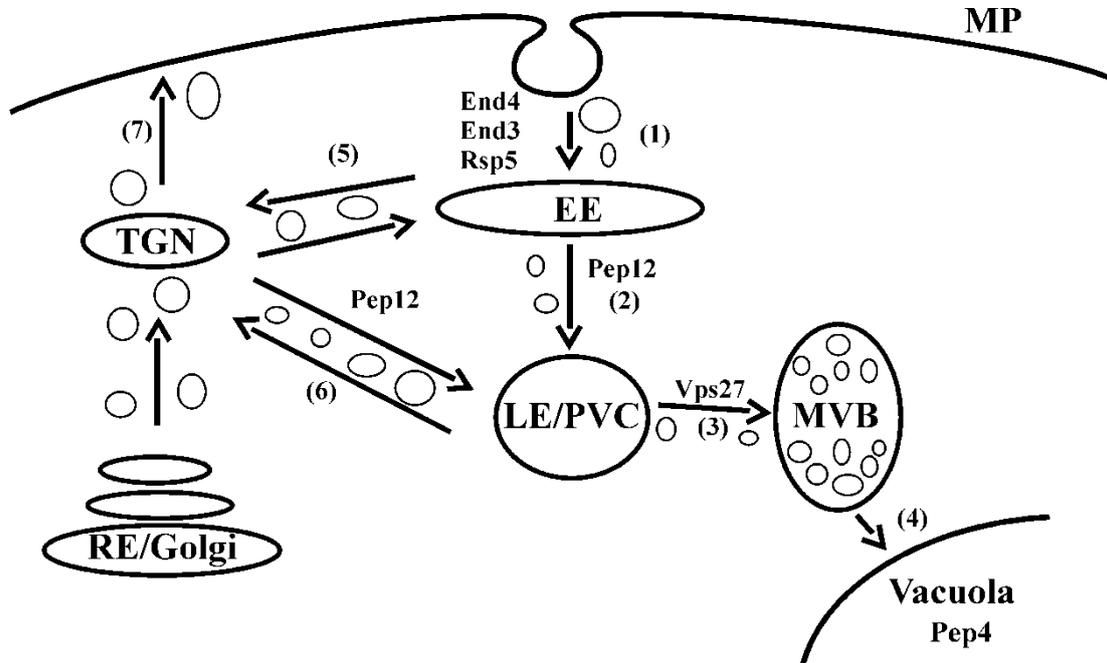


Figura 8. Principales rutas de tráfico intracelular de las proteínas de membrana. Las proteínas presentes en la superficie celular son endocitadas en respuesta a diferentes señales. Las vesículas formadas se fusionan a continuación con los endosomas tempranos (1) y éstos pueden madurar a endosomas tardíos (2) y, posteriormente, dar lugar al cuerpo multivesicular (3). Esta estructura se fusiona con la vacuola liberando su contenido en el interior (4). Las proteínas presentes en la ruta de secreción pueden ser enviadas directamente a las vacuolas mediante un primer paso de transporte en vesículas a endosomas tempranos (5) o a los endosomas tardíos (6). En todos estos puntos intervienen numerosas proteínas, algunas de las cuales se indican en la figura. MP, membrana plasmática; EE, endosomas tempranos; LE/PVC, endosomas tardíos /compartmento prevacuolar; MVB, cuerpo multivesicular; TGN, red trans-golgi; RE, retículo endoplasmático. Adaptado de [274].

Uno de los mecanismos moleculares de control de la localización de los transportadores de nutrientes mejor caracterizado es la ubiquitinación [125]. Este sistema de marcaje de proteínas se basa en la unión covalente de un polipéptido de 76 aminoácidos, la ubiquitina, a residuos de lisina de la proteína diana [284]. Se trata de un proceso secuencial en el que intervienen varias enzimas. Inicialmente, la ubiquitina libre es activada por una enzima E1 (enzima activadora) formándose un intermediario con un enlace tio-éster de alta energía, E1~S~Ub. A continuación, una enzima E2 (conjugadora de Ub) toma la Ub activada y forma con ella otro enlace tio-éster de alta energía, E2~S~Ub. Estas enzimas E2, posteriormente, interaccionan con una enzima E3 (ligasa de ubiquitina) que directa o indirectamente permiten la unión de la ubiquitina al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana a través de su extremo carboxilo,

formándose un enlace isopeptídico. Existen dos tipos de enzimas E3, que se diferencian principalmente en su participación en esta reacción: las RING finger y las HECT. Las primeras no catalizan directamente la reacción sino que su función es aproximar la enzima E2 al sustrato para que esta lo ubiquitine. En el caso de las E3 del tipo HECT son estas las que catalizan la reacción de ubiquitinación, previa transferencia de la ubiquitina de la enzima E2 a una cisteína conservada del dominio HECT [22, 137]. Estas enzimas pueden actuar sobre una proteína previamente ubiquitinada añadiendo nuevas ubiquitinas al residuo de ubiquitina ya presente, lo que daría lugar a cadenas de ubiquitina. Este mecanismo de poliubiquitinación no se conoce en profundidad, sugiriéndose la participación de una nueva familia de enzimas denominadas E4. La modificación por ubiquitina es un proceso reversible, gracias a la participación de unas hidrolasas de ubiquitina (DUB) que rompen el enlace isopeptídico y liberan las moléculas de ubiquitina (Fig. 9). Este mecanismo dinámico es necesario para mantener unos niveles adecuados de ubiquitina libre [284].

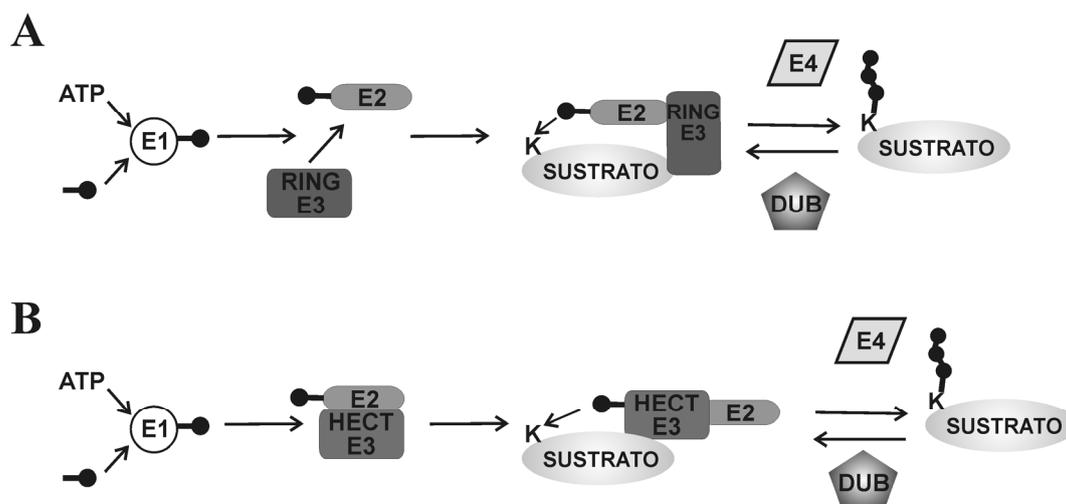


Figura 9. Cascada de ubiquitinación. La ubiquitina es activada por la acción de la enzima E1 a la que se une en un residuo de cisteína específico. A continuación esta ubiquitina se une a la enzima E2. La enzima E3 de tipo RING promueve la transferencia de la ubiquitina desde E2 a una lisina específica del sustrato (A) Por su parte, la E3 HECT une ubiquitina y cataliza directamente la formación del enlace isopeptídico con la lisina del sustrato (B). Las enzimas E4 parecen favorecer la formación de cadenas de poliubiquitina y la enzimas de desubiquitinación (DUB) retiran ubiquitinas de los sustratos. Adaptado de [284].

El efecto de la ubiquitinación es diverso en los diferentes tipos de proteínas. En el caso de las proteínas citosólicas suele intervenir en el marcaje de la proteína para su degradación en el proteasoma [110], mientras que en el caso de las proteínas de

membrana, su ubiquitinación suele acarrear la internalización y degradación vacuolar [128]. Estas diferencias se reflejan también en diferencias en los niveles de ubiquitina unida a la proteína. En el caso de las proteínas de membrana habitualmente se trata de monoubiquitinación, multiubiquitinación (varias ubiquitinas unidas a lisinas distintas) o poliubiquitinación (cadenas de ubiquitina unidas a una lisina [96]).

En *S. cerevisiae* la ligasa de ubiquitina Rsp5 es la responsable de la ubiquitinación de la mayor parte de las proteínas de membrana [118]. Esta ligasa pertenece al grupo de las HECT y se encuentra asociada a invaginaciones de la membrana plasmática y a otros compartimentos endocíticos a través de su dominio C2 [305]. Contiene tres dominios WW que median la interacción proteína-proteína. Su papel en la ubiquitinación y endocitosis de transportadores de membrana se identificó inicialmente en la permeasa general de aminoácidos Gap1 y en la permeasa de uracilo Fur4 [122]. Posteriormente, se determinó la implicación de esta ligasa en multitud de funciones celulares, tales como: regulación de la transcripción, biosíntesis de ácidos grasos insaturados, regulación del pH intracelular, entre otras [135]. Dentro del papel de la ubiquitinación mediada por Rsp5 en la localización celular de transportadores de membrana, se ha mostrado la participación de esta modificación en una ruta alternativa de distribución de estas proteínas a nivel de la vía de secreción. En estos casos, la ubiquitinación de estas moléculas es responsable de su envío directo a la vacuola para su degradación sin necesidad de un paso previo por la membrana plasmática. Para estas proteínas el papel ejercido por la ubiquitinación es diverso. En el caso Gap1 su ubiquitinación impide la llegada a membrana plasmática [279]. Para Fur4, la ubiquitinación es necesaria para su entrada en el cuerpo multivesicular aunque no es la señal requerida para el envío de la proteína a través de esta ruta [31].

En los últimos años se ha avanzado en la identificación de los factores implicados en el reconocimiento de la proteína diana por la maquinaria de ubiquitinación. En el caso de la ligasa de ubiquitina Rsp5 (Fig. 10) se ha establecido que su dominio C2 es requerido para su localización celular, aunque su delección afecta a la internalización de algunos transportadores sin modificaciones en su ubiquitinación [305]. Por este motivo se ha sugerido el papel de esta enzima en la endocitosis independiente de su actividad catalítica. Por otro lado, los denominados dominios WW de esta enzima están implicados en el reconocimiento del sustrato a través de los motivos PPx-Y. La mutación en estos dominios WW afecta drásticamente a la Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

ubiquitinación dependiente de Rsp5 al impedir el reconocimiento del sustrato. Sin embargo, muchas de las proteínas ubiquitinadas por Rsp5 carecen de los motivos PPx-Y por lo que es necesaria la presencia de proteínas adaptadoras que se unan a los dominios WW de Rsp5 y a otras regiones de la proteína diana, con el fin de aproximar a la ligasa de ubiquitina a la molécula que va a ser marcada. Se han identificado muchas moléculas candidatas a ser adaptadoras para Rsp5, como son los casos de Bsd2 [127, 286] o de las proteínas Bul [317]. En *S. cerevisiae* se han caracterizado dos proteínas Bul, Bul1 y Bul2 [316, 317] que interactúan con Rsp5 a través de su motivo PPx-Y. Ambas proteínas participan en el reconocimiento de algunos sustratos de esta enzima como es el caso de la permeasa general de aminoácidos [123]. Otras de las proteínas que funcionan como adaptadoras entre la proteína diana y Rsp5 son las arrestinas, ARTs (“*Arrestin-related Trafficking Adaptors*”), que contienen motivos PY en su extremo C-terminal [167]. Así, las arrestinas Art1 y Art2 están implicadas en ubiquitinación de algunos transportadores de membrana en levaduras [167].



Figura 10. Representación de ScRsp5. Se recoge su dominio C2, WW y HECT [167].

La ubiquitinación de una proteína se produce en sitios específicos. En algunas proteínas de membrana de levaduras se ha encontrado que la ubiquitinación es dependiente de una secuencia similar a la consenso (D/E)XK(S/T), siendo la lisina el sitio de unión de ubiquitina [82, 118, 135]. Generalmente, estas mismas proteínas presentan más de un sitio de ubiquitinación, pudiendo suplir unos la pérdida de otros. En otras proteínas de membrana se ha observado que la ubiquitinación ocurre en lisinas que no cumplen la secuencia consenso anterior. Sin embargo, los sitios de ubiquitinación se encuentran dentro o cerca de una secuencia que presenta características de secuencia PEST. Estas secuencias constituyen señales de destrucción de proteínas citosólicas al promover la ubiquitinación de éstas para su degradación en el proteasoma [242, 250]. Se trata de secuencias hidrofílicas iguales o mayores a 12 residuos, que contienen al menos 1 residuo de Pro, 1 Glu o Asp, 1 Ser o Thr y se encuentran flanqueados por residuos cargados positivamente. Las secuencias tipo PEST de las proteínas de membrana se caracterizan por la baja frecuencia de prolina. Estas

secuencias que aparecen en Fur4 [182], Mal61 [196] y Ste3 [253] entre otros, se encuentran en la regiones citoplásmicas de la proteína tanto en el extremo amino como carboxílico, así como en bucles internos de la proteína.

Estas señales de ubiquitinación pueden ser reguladas por la fosforilación en residuos internos o cercanos a éstas. La fosforilación de estos residuos, que se produce cuando la proteína llega a la membrana plasmática o aumenta en respuesta a la unión del ligando en el caso de Ste2 [243]; es necesaria en Ste2 y Fur4 para que las proteínas se ubiquitinen eficientemente. La fosforilación de las serinas de la secuencia PEST de Fur4 es requerida para la ubiquitinación en residuos de lisina próximos [182]. En el transportador Ste6 una treonina situada en una región ácida de la proteína es necesaria para la eficiente fosforilación, ubiquitinación e internalización del transportador [151]. La fosforilación de Ste6 o de Fur4 podría estar implicada en su reconocimiento por parte de la maquinaria de ubiquitinación, ya sea directamente por la ligasa de ubiquitina o indirectamente a través de una proteína adaptadora. En cualquier caso, esta relación puede ser debida a una interacción directa con las secuencias fosforiladas o a que esta fosforilación exponga los sitios de unión a la maquinaria de ubiquitinación. Sin embargo, no siempre se observa una relación tan clara entre la fosforilación y la ubiquitinación de la proteína, en ocasiones, esta fosforilación parece tener un papel opuesto [281].

4. Señales y mecanismos de señalización.

S. cerevisiae es capaz de adaptarse a las distintas fuentes nitrogenadas presentes en el medio, expresando distintos tipos de transportadores. Estos transportadores suelen estar sometidos a distintos mecanismos de regulación postraduccional que responden a señales de origen diverso. Normalmente suelen ser los cambios fisiológicos de las células los que causan la alteración de la distribución celular de estas proteínas. Para las permeasas de fuentes de nitrógeno, la calidad de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio suele ser el determinante de la regulación de uno u otro transportador. Así, en el caso de permeasas implicadas en el transporte de fuentes de nitrógeno no preferentes como la prolina o la urea, la presencia de estos compuestos favorece la llegada a membrana y la estabilidad en ella de estos transportadores. Mientras que la adición al medio de fuentes de nitrógeno favorables como la glutamina o altas concentraciones de aminoácidos, causa la ubiquitinación de la proteína y su

consecuente envío directo a vacuola desde la superficie celular y desde la ruta de secreción [65, 118]. Este mismo comportamiento se observa en Ynt1, donde el nitrato o la ausencia de fuentes nitrogenadas favorecen la llegada a membrana del transportador. La adición de glutamina produce la ubiquitinación y degradación vacuolar de Ynt1 [212, 213]. El comportamiento opuesto se observa para aquellas permeasas implicadas en el transporte de fuentes de nitrógeno preferentes tales como: Tat2 o Bap2 [24, 219, 220]. En estos casos es la limitación de nitrógeno, ya sea por ausencia de fuente de nitrógeno o por la presencia de fuentes pobres, la que causa la ubiquitinación y distribución vacuolar de las proteínas, que se muestran muy estables en condiciones nutricionales más favorables. Para otros tipos de transportadores como Fur4, la permeasa de alta afinidad de uracilo, la presencia de condiciones adversas como el ayuno de nitrógeno y de carbono, al igual que un exceso de uracilo, causa su regulación negativa por ubiquitinación [273].

La maquinaria celular implicada en el reconocimiento de estas señales varía en función de los diferentes tipos de transportadores. En algunos casos, como en el de Fur4, es la propia unión del sustrato al transportador la que activa los mecanismos de regulación postraduccional [273]. Sin embargo, para otros transportadores es necesaria una compleja ruta de señalización en la que intervienen otras proteínas. Uno de los ejemplos más destacados es el de la quinasa de proteínas Npr1 (“*Nitrogen Permease Reactivator 1*”) y su participación en la regulación de numerosas permeasas de aminoácidos de *S. cerevisiae* [76, 187, 215, 219, 267]. Diversos estudios han mostrado que los eventos de fosforilación mediados por esta quinasa de proteínas juegan un papel central en el control de estas permeasas en respuesta a las condiciones del medio. La actividad de esta quinasa previene la endocitosis y el envío directo Golgi vacuola de Gap1 y de Ynt1 en condiciones de limitación de nitrógeno [76, 187, 213]. La inactivación de Npr1 conlleva la ubiquitinación de la proteína y su envío a la vacuola para su degradación. El caso opuesto se observa para las permeasas Tat2 y Bap2, que requieren de una forma inactiva de la proteína para localizarse en la membrana plasmática en condiciones de ausencia de nitrógeno. En este caso, la activación de Npr1 provoca su ubiquitinación y degradación en estas condiciones [219, 267]. Por lo tanto, Npr1 parece actuar de manera opuesta en función del tipo de permeasa que se trate. A pesar de estas evidencias se desconoce el sustrato o sustratos de esta enzima. Sin

embargo, si se ha logrado identificar una secuencia consenso (K/R-X-X-S-K/R) en los sustratos susceptibles de ser fosforilados por Npr1 [102].

La actividad de esta quinasa también parece estar regulada a través de las condiciones del medio mediante un mecanismo de fosforilación [267]. De manera que en presencia de fuentes preferentes de nitrógeno la proteína se encuentra fosforilada e inactiva, situación contraria a la observada en situaciones de limitación de nitrógeno, donde la proteína se encuentra activa y no fosforilada. Se sugiere que esta regulación es dependiente de la ruta de las quinasas TOR por el hecho de que el tratamiento con rapamicina supone la desfosforilación de la proteína incluso en medios ricos. De hecho, se han identificado unos 22 sitios de fosforilación en Npr1, de los cuales, 20 de ellos son sensibles al tratamiento con rapamicina [101].

Las quinasas Hal4/5, pertenecientes a la misma familia que Npr1, también participan en la regulación de otros transportadores de membrana. Se identificaron porque su mutación confería sensibilidad a Na⁺ y Li⁺ y su sobreexpresión confería tolerancia a estos cationes [207]. Se ha mostrado que regulan la localización celular de Trk1 [228], responsable junto con Pma1, de regular el potencial de membrana. Este hecho podría explicar la sensibilidad de los mutantes $\Delta hal4\Delta hal5$ a estos cationes. El papel de estas quinasas no queda reducido a Trk1, sino que participan además en regular la estabilidad celular de otros transportadores de nutrientes como Can1 (permeasa de arginina), Fur4 (permeasa de uracilo) y Hxt1 (permeasa de glucosa de baja afinidad) bajo condiciones limitantes de K⁺.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

En general los genes de la vía de asimilación de nitrato se inducen por nitrato y se reprimen por fuentes preferidas de nitrógeno. Está bien establecido que en hongos filamentosos, levaduras y algas, el nitrato actúa como inductor una vez en el interior celular [276, 311]. En la levadura *Hansenula polymorpha*, Ynt1 es el principal transportador de nitrato, transporta nitrato y nitrito con alta afinidad y sus niveles se regulan mediante fosforilación y ubiquitinación dependiendo del balance intracelular de fuentes preferentes / no preferentes de nitrógeno [212, 213]. El transporte de nitrato se realiza en contra de un gradiente electroquímico, generado por la actividad de la H⁺-ATPasa [84, 193, 194]. Se produce siguiendo una estequiometría 2H⁺:1NO₃⁻ y se sugiere que el K⁺ podría ser importante para contrarrestar la entrada de cargas negativas aportadas por el NO₃⁻ [84]. Además se ha observado que el K⁺ es importante para regular la estabilidad en la superficie celular de varias permeasas de levaduras [228].

Es un hecho bien contrastado que existe un desbalance entre el nitrato transportado al interior de la célula y el nitrato asimilado. Así, se observa excreción de nitrito y muy probablemente de nitrato en células incubadas en nitrato. Por otro lado, se le ha atribuido a la NR un papel en la entrada neta de nitrato [297]. Nuestro grupo, sin embargo, postula la presencia de sistemas de excreción de nitrato como los responsables de la ausencia de transporte neto de nitrato en las cepas deficientes de nitrato reductasa. De manera más precisa podemos resumir los objetivos de esta tesis en los siguientes puntos:

- 1- Estudio del papel de las permeasas de sulfito Ssu1 y Ssu2 en la excreción de nitrato y nitrito en la levadura *H. polymorpha*. Implicación en la asimilación de nitrato.
- 2- Caracterización de los sistemas de transporte de potasio en nuestro organismo modelo. Aproximación a la relación del K⁺ con el transporte de nitrato vía Ynt1.
- 3- Estudio del papel del flujo de nitrato a través de Ynt1 en la regulación de la nitrato reductasa en la vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha*.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. La permeasa de sulfito Ssu2 participa en la excreción de nitrato en *H. polymorpha*.

*En este capítulo se describe la primera permeasa identificada en hongos encargada de la excreción de nitrato. Se trata de una proteína implicada además en la excreción de sulfito. Hay que tener en cuenta que *H. polymorpha* transporta más nitrato del que es capaz de asimilar. La excreción de este nitrato permite mantener los niveles intracelulares de nitrito y de amonio en equilibrio para evitar sus efectos tóxicos y mantener la viabilidad celular en nitrato. La expresión del gen ortólogo de *S. cerevisiae* en nuestra levadura modelo nos permitió observar que la función de esta permeasa de sulfito como sistema de excreción de nitrato no es un hecho aislado y exclusivo de *H. polymorpha*, sino que se mantiene aún cuando el organismo no es capaz de asimilar nitrato.*

1.1. El genoma de *H. polymorpha* presenta dos genes que codifican permeasas similares a ScSSU1.

La levadura *H. polymorpha* se caracteriza por excretar importantes cantidades de nitrito en presencia de nitrato, es por ello que nos planteamos identificar los sistemas implicados en la excreción de este intermediario tóxico. Hasta el inicio de este trabajo no se habían identificado sistemas implicados específicamente en la excreción de nitrito y nitrato, sino de transportadores de nitrato y nitrito. En bacterias se han identificado algunos transportadores que además de transportar nitrito, son capaces de excretarlo, como es el caso de NarU [58]. En el alga *Chlamydomonas*, *NARI.1* y *NARI.2*, son transportadores de nitrito, responsables de su transporte al interior del cloroplasto [97, 244, 245].

Decidimos estudiar el posible papel que tendría en *H. polymorpha* la permeasa de sulfito Ssu1 en la excreción de nitrito, pues además del parecido estructural entre el sulfito y el nitrito, ScSsu1 se induce en presencia de óxido nítrico o de compuestos generadores del mismo y de nitrito [261]. Por otro lado, la nitrato reductasa bajo determinadas condiciones es capaz de producir óxido nítrico a partir de la reducción del nitrito [246]. El óxido nítrico resulta tóxico para las células, y es por ello, que los organismos han desarrollado mecanismos de detoxificación, siendo la acción de las flavohemoglobinas de los más importantes. Las flavohemoglobinas protegen de su toxicidad transformándolo a nitrato [124]. Teniendo en cuenta estas observaciones, nos preguntamos si este gen en *H. polymorpha* podría participar en la excreción del nitrito,

del probable NO producido tras la reducción del nitrito, e incluso del propio nitrato. Asimismo, nos preguntamos si además podía participar en la extrusión de otros compuestos similares al nitrato como el clorato y/o clorito.

La búsqueda en el genoma de *H. polymorpha* de genes que codifiquen proteínas con alta similitud a la secuencia de ScSSU1 nos permitió identificar dos proteínas ortólogas a la permeasa de sulfito de *S. cerevisiae*, denominadas Ssu1 y Ssu2 respectivamente. Las características de las proteínas Ssu1 y Ssu2 se muestran en la tabla 2. El análisis bioinformático de ambas proteínas reveló que al igual que ScSsu1 son proteínas de membrana con 10 y 8 dominios transmembranales respectivamente (Fig.11), pertenecientes a la familia de transportadores de membrana TDT (“*Tellurite-resistance/Dicarboxylate Transporter Family*”). En esta familia también se incluyen el transportador de telurio TehAp de *E. coli* (Turner, Walter), el transportador de malato Mae1p de *S. pombe* (Grobler) y Ssu1 de *Aspergillus fumigatus* [162] entre otros, implicados en la excreción de compuestos tóxicos. Se caracterizan por poseer el dominio “C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport”.

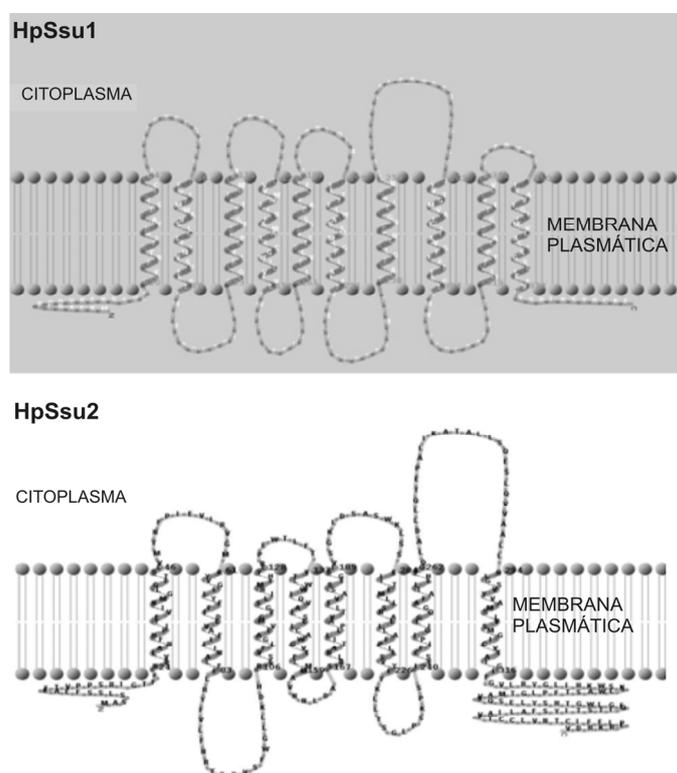


Figura 11. Representación topológica de HpSsu1 y HpSsu2. Los putativos dominios transmembranales fueron determinados usando los programas SOSUI y PREDICT PROTEIN PHDhtm.

Tabla 2. Principales características de HpSsu1 y HpSsu2.

	HpSsu1	HpSsu2	ScSsu1
Masa Molecular (Da)	43715.61	43481.49	52545.22
pI	8.08	7.03	8.73
Número de residuos	384	392	458
Dominio C4-dic-mal-tran	35-335	30-345	15-370
Similitud	27%	26%	-

El análisis bioinformático no nos permitió decantarnos por ninguna de estas proteínas como ortólogas de ScSsu1 por lo que decidimos interrumpir ambos genes.

La interrupción se realizó mediante reemplazamiento de la copia funcional del gen por una deletada, que incorporaba un marcador auxotrófico para el caso de *SSU1*, y un marcador que confería resistencia al antibiótico zeocina para el caso de *SSU2*. Las cepas mutantes $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ se analizaron fenotípicamente con el fin de identificar su posible relación con la excreción de sulfito y de nitrito. Ambas cepas mostraron cambios significativos en varios de los fenotipos ensayados, siendo en el mutante $\Delta ssu2$ mucho más importantes.

1.2. Ssu1 y sobre todo Ssu2 modifican el flujo de nitrato y la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato.

1.2.1. HpSsu1 y HpSsu2 participan en la extrusión de sulfito.

ScSSU1 fue identificado por su capacidad para complementar una mutación que causaba sensibilidad a sulfito [315] posteriormente se confirmó su papel como permeasa de sulfito [225]. De esta forma, nuestra primera aproximación fue analizar la sensibilidad de los mutantes $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ a sulfito. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, los mutantes $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ son sensibles a sulfito. Sin embargo, existen diferencias entre dichos mutantes en cuanto a la sensibilidad a este compuesto, siendo más sensible $\Delta ssu2$ (Fig. 12). Las cepas portadoras de varias copias de *SSU2* (*nSSU2*) revertían el fenotipo de sensibilidad a sulfito de $\Delta ssu2$, con lo cual podíamos asegurar que los fenotipos observados se debían al gen *SSU2*. Al tener más copias del gen *SSU2* crecían mejor que el WT en sulfito. No obstante, en el caso de la cepa *nSSU1*, no se observaba un incremento de la resistencia a sulfito similar al de la cepa *nSSU2*, sino que se comporta como la cepa silvestre, pero era capaz de revertir el fenotipo de sensibilidad

a sulfito del mutante $\Delta ssu1$. El doble mutante $\Delta ssu1\Delta ssu2$ mostraba el mismo fenotipo de sensibilidad a sulfito que la cepa $\Delta ssu2$. Estos resultados sugieren que estas proteínas también podrían participar en la excreción de sulfito al exterior celular, siendo Ssu2 la más importante en dicha función.

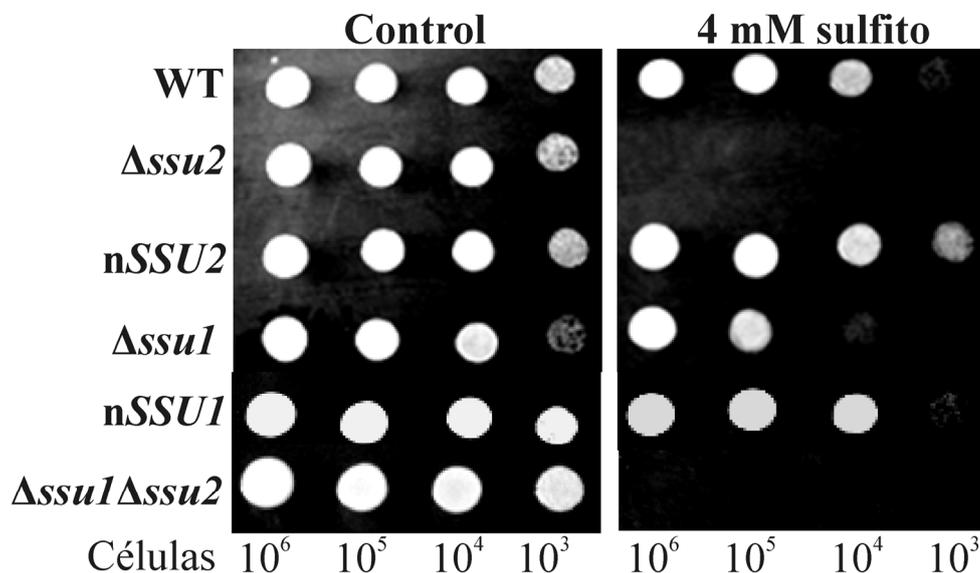


Figura 12. HpSSU1 y HpSSU2 están implicadas en la tolerancia a sulfito. Las células crecidas previamente en YPD, se sembraron por goteo en medios con 5 mM de amonio (control) y la concentración indicada de sulfito sódico. Se tamponaron a pH 3.5 con 75 mM de ácido tartárico-Tris. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días.

1.2.2. El mutante $\Delta ssu2$ presenta un incremento en el consumo de nitrato.

Tras verificar que Ssu1 y Ssu2 podrían ser proteínas ortólogas a ScSsu1, evaluamos si Ssu1 y Ssu2 estaban implicadas en la excreción de nitrato y/o nitrito. Para ello, en primer lugar, analizamos el consumo de nitrato en los mutantes $\Delta ssu1$, $\Delta ssu2$, $\Delta ssu1\Delta ssu2$ y en la cepa *nSSU2* (Fig. 13). El consumo de nitrato que da cuenta de la desaparición de este sustrato del medio, era prácticamente nulo en la cepa *nSSU2*, mientras que los mutantes $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ presentaban una mayor tasa de consumo de nitrato que la cepa WT, siendo en el mutante $\Delta ssu2$ donde el incremento era mucho mayor. El doble mutante presentaba unos valores similares al mutante $\Delta ssu2$. Si bien, nuestra hipótesis inicial era ver la participación de estas proteínas en la excreción fundamentalmente de nitrito, estos resultados nos indicaban que Ssu1 y sobre todo Ssu2 podrían estar implicadas en la excreción de nitrato al medio extracelular. La mutación

de *SSU1* y *SSU2* permitía a las células acumular nitrato en su interior, y así, la desaparición del nitrato del medio era más rápida.

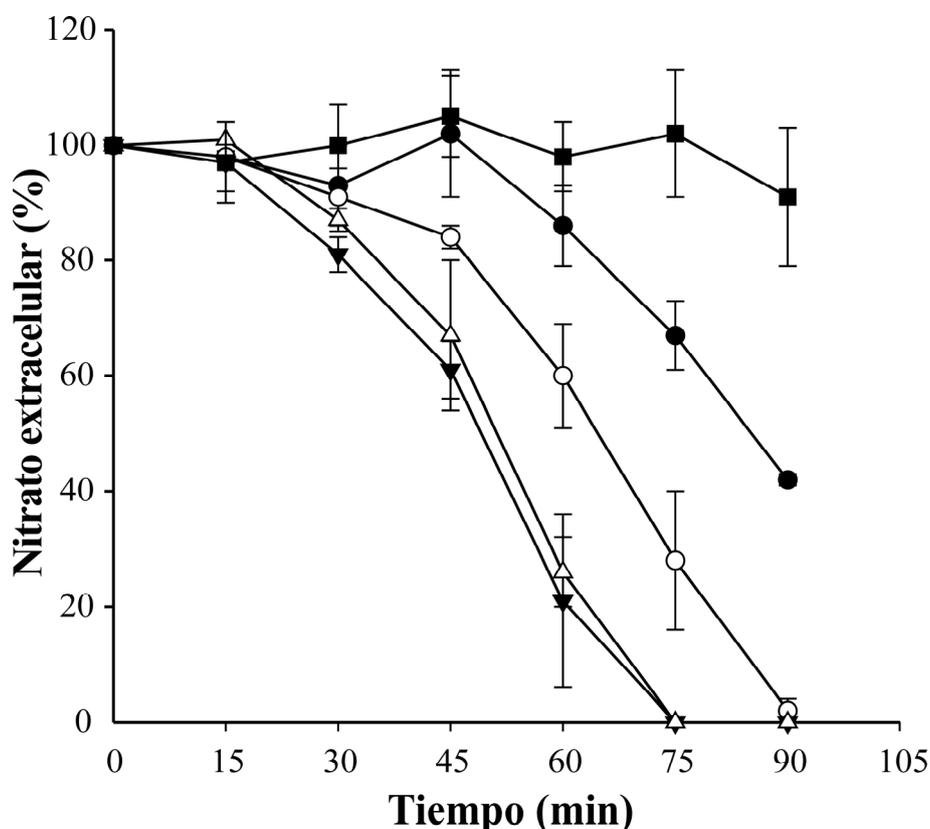


Figura 13. $\Delta ssu1$ y sobre todo $\Delta ssu2$ presentan un incremento del consumo de nitrato. Células crecidas en 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml se sometieron a ayuno de nitrógeno durante 90 min. Transcurrido este tiempo se les añadió 0.5 mM de nitrato y se analizó su desaparición en el medio en las cepas WT (●), $\Delta ssu1$ (○), $\Delta ssu2$ (Δ), $\Delta ssu1\Delta ssu2$ (▼) y nSSU2 (■).

1.2.3. La expresión de los genes inducidos por nitrato aumenta en el mutante $\Delta ssu2$.

Si analizamos los resultados de consumo de nitrato con más detalle (Fig. 13), observamos que el nitrato se consume más rápidamente en la cepa $\Delta ssu1$ y mucho más en el mutante $\Delta ssu2$, pues en éste último el porcentaje de nitrato del medio ronda el 60% tras 45 min de incubación en nitrato, mientras que en la cepa WT es del 100%. Estas observaciones indicaban que la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato podía verse afectada. Para contrastar esta hipótesis determinamos la expresión del gen de la nitrato reductasa, *YNR1*, fusionado al gen reportero *lacZ* en $\Delta ssu2$ y nSSU2 (Fig. 14A). Tras 2 horas de inducción en 1 mM de nitrato los valores de expresión de

YNR1 en la cepa $\Delta ssu2$ son aproximadamente del 120% con respecto al WT y de un 50% en la cepa *nSSU2*.

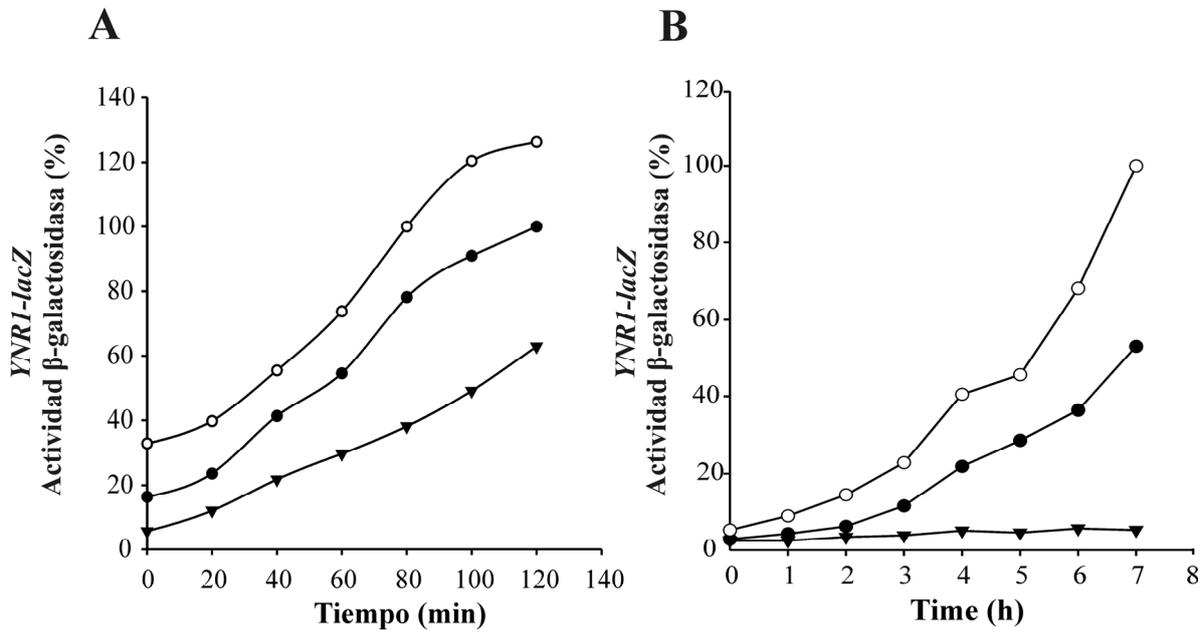


Figura 14. La interrupción de *SSU2* afecta a los niveles de expresión de los genes inducidos por nitrato. **A.** Células crecidas en 5 mM de amonio se sometieron a ayuno de nitrógeno durante 1h antes de añadirle 1 mM de nitrato. A los tiempos indicados se tomaron muestras para medir la actividad β -galactosidasa en las cepas WT (●), $\Delta ssu2$ (○) y *nSSU2* (▼) portadoras de la construcción *YNR1-lacZ*. El 100% de actividad se corresponde a valores de 440 nmoles *o*-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹. Los ensayos fueron repetidos 3 veces sin variaciones significativas en ambos casos. **B.** Se incubaron las cepas WT *P_{YNR1}-lacZ* (▼), $\Delta yn r1$ *P_{YNR1}-lacZ* (●) e $\Delta yn r1 \Delta ssu2$ *P_{YNR1}-lacZ* (○) en un medio sin fuente de nitrógeno durante 7 horas. El 100% de actividad se corresponde con valores de 726 nmoles *o*-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹.

En este contexto cuantificamos también la expresión del gen *YNR1* pero en cepas carentes del gen de la nitrato reductasa y de *SSU2* en un medio sin ninguna fuente de nitrógeno. Ya se había observado que en ausencia del gen de la nitrato reductasa y de nitrato en el medio, el gen *YNR1* se induce casi 100 veces más que en el WT [211]. Esta inducción es provocada por las trazas de nitrato presentes en el medio, de forma que al estar interrumpida la nitrato reductasa, el nitrato no puede ser reducido a amonio y estas trazas inducen permanentemente dicho gen [211]. En la figura 14B se observa que la inducción del gen *YNR1* es mayor y más rápida en $\Delta yn r1 \Delta ssu2$ que en $\Delta yn r1$. En $\Delta yn r1 \Delta ssu2$ la acumulación de trazas de nitrato es mucho mayor que en el mutante $\Delta yn r1$, con lo cual la inducción de *YNR1* se ve favorecida. Por el contrario, en la cepa WT la inducción del gen de la nitrato reductasa es escasa, pues las trazas de nitrato son reducidas a amonio. El aumento de la expresión de los genes inducidos por nitrato que

muestra la cepa $\Delta ssu2$ también se observa en los niveles de Ynt1 determinados por inmunoblot (Fig. 15). En el mutante $\Delta ssu2$ la cantidad de proteína es ligeramente superior al WT, mientras que en la cepa $nSSU2$ los niveles de Ynt1 son menores a los del WT como consecuencia del retraso en la inducción que presenta la cepa $nSSU2$.

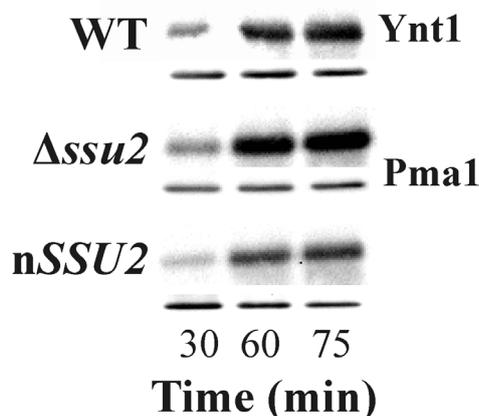


Figura 15. Niveles de Ynt1 en WT, $\Delta ssu2$ y $nSSU2$. Las células crecidas en amonio, se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 60 min. Tras este tiempo se añadió 1 mM de nitrato y se determinó Ynt1 a los tiempos indicados Pma1 se usó como control de carga. Se cargaron 10 μ g de proteínas.

Otro de los resultados que ponen en evidencia que Ssu1 y sobre todo Ssu2 son capaces de modificar el nitrato intracelular y por tanto, la inducción de los genes de la vía, es la excreción de nitrito. *H. polymorpha* se caracteriza por excretar nitrito al medio cuando crece en nitrato. Este nitrito es consecuencia de la reducción del nitrato por acción de la nitrato reductasa, de forma que cuanto mayor sea la entrada de nitrato, mayor será la inducción, mayor será la expresión del gen *YNR1* y por tanto, mayor será la cantidad de nitrito producido y excretado. No todo el nitrato que es transportado al interior celular es reducido a amonio, sino que existe un desbalance entre el nitrato transportado y reducido a nitrito y el nitrato asimilado (el que se reduce a amonio antes de incorporarse al esqueleto carbonado de los aminoácidos). Como se recoge en la figura 16, la excreción de nitrito en $\Delta ssu2$ ocurre mucho antes que en el WT, mientras que en la cepa $nSSU2$ la excreción de este intermediario es mucho más lenta y en menor cantidad. Asimismo, el nitrito que es excretado al medio también se consume más rápido en el mutante $\Delta ssu2$ que en el WT. La escasa excreción de nitrito de la cepa $nSSU2$ puede deberse a la baja expresión de los genes inducidos por nitrato como consecuencia del alto flujo de nitrato al medio extracelular que existe a través de Ssu2.

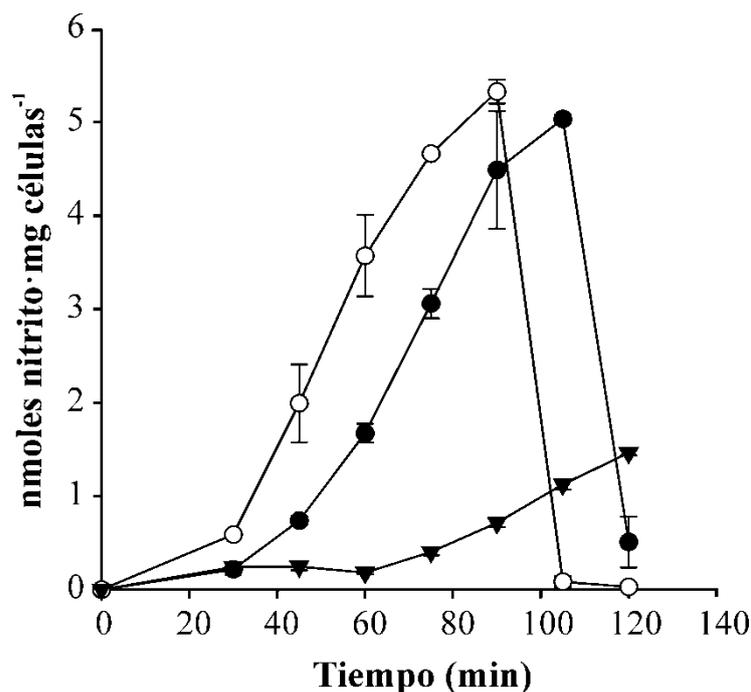


Figura 16. Evolución de la excreción de nitrato en la cepa WT, $\Delta ssu2$ y nSSU2. Las células crecidas en 5 mM de amonio hasta una concentración de 10 mg/ml, se resuspendieron en un medio carente de nitrógeno durante 90 min antes de añadirle 1 mM de nitrato. WT (●), $\Delta ssu2$ (○) y nSSU2 (▼).

1.2.4. La actividad nitrato reductasa no es requerida para el transporte de nitrato en *H. polymorpha*.

Kinghorn y colaboradores [297] sugieren que la actividad nitrato reductasa es requerida para el transporte neto de nitrato en hongos, pues mutantes del gen de la nitrato reductasa de los hongos *A. nidulans* y *N. crassa*, no presentaban transporte de nitrato, a diferencia de lo que ocurría en plantas. Estos autores atribuían la ausencia de transporte de nitrato en hongos, a la ausencia de la enzima nitrato reductasa, pero no contemplaban la existencia de un posible flujo de nitrato al exterior celular, como causa de este bajo transporte de nitrato.

Una cepa carente del gen *YNRI* presenta un consumo de nitrato nulo o indetectable en las condiciones que normalmente se mide. Sin embargo, en el doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$ si detectamos una disminución del nitrato del medio, a diferencia de lo que ocurre en un mutante $\Delta ynr1$ (Fig. 17). Estos resultados evidencian que son los sistemas de excreción de nitrato, los responsables de la ausencia de transporte neto en mutantes de la nitrato reductasa y no la falta de este gen.

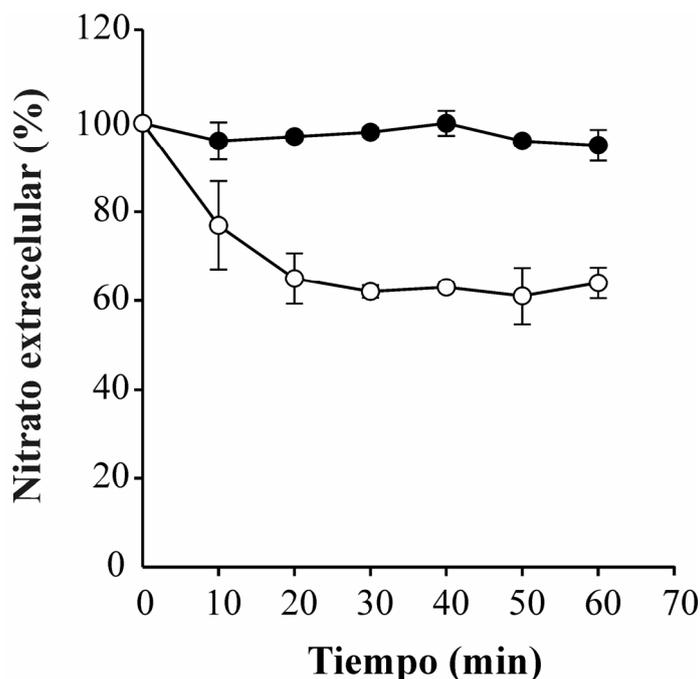


Figura 17. Consumo de nitrato en $\Delta ynr1$ e $\Delta ynr1\Delta ssu2$. Células crecidas en 5 mM de amonio se resuspendieron a una concentración de 50 mg/ml en un medio carente de nitrógeno durante 90 min. El consumo de nitrato se inició añadiendo 0.05 mM de nitrato en las cepas $\Delta ynr1$ (●) e $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (○).

1.2.5. El consumo de nitrito no se ve afectado con la interrupción de *SSU2*.

Teniendo en cuenta que nuestra idea de partida era estudiar si Ssu1 y Ssu2 podrían participar en la excreción de nitrito, analizamos el consumo de nitrito en los mutantes $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ (Fig. 18). El consumo de nitrito en la cepa $\Delta ssu2$ era ligeramente superior al WT. La cepa $\Delta ssu1$ mostraba un comportamiento intermedio entre el mutante $\Delta ssu2$ y el WT. Estas pequeñas diferencias en el consumo de nitrito entre las cepas $\Delta ssu2$ y $\Delta ssu1$ podrían ser debidas a las diferencias en inducción que existen entre ellas. Sin embargo, estas diferencias se hacen notables cuando se compara un mutante de la nitrato reductasa con el doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$. En ambos casos el consumo de nitrito es mayor que en el WT, pero sigue siendo mucho mayor y más rápido en la cepa $\Delta ynr1\Delta ssu2$. Pensamos que el aumento en el consumo de nitrito se debe al aumento de la expresión de los genes inducidos por nitrato que existe en la cepa $\Delta ssu2$ con respecto al mutante $\Delta ynr1$ consecuencia del aumento de la acumulación intracelular de nitrato en $\Delta ssu2$. También podría indicar que Ssu2 fuera capaz de excretar nitrito; sin embargo, de ser así, deberíamos observar una disminución en la

excreción de nitrito y como ya explicamos anteriormente, ocurre todo lo contrario, $\Delta ssu2$ excreta más nitrito que el WT.

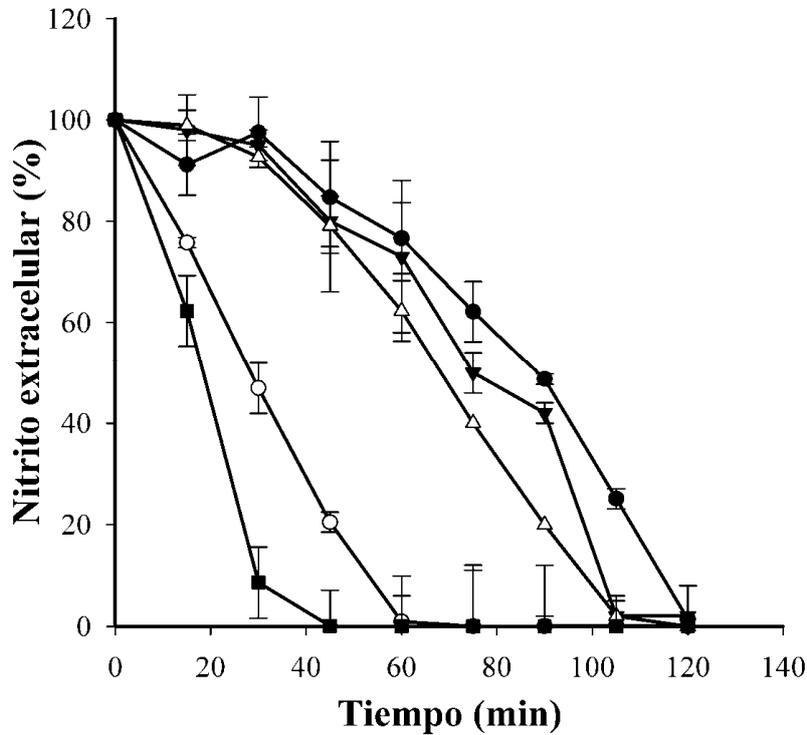


Figura 18. $\Delta yn r 1 \Delta ssu 2$ presenta un mayor consumo de nitrito. Las células crecidas en 5 mM de amonio, se incubaron a una concentración de 10 mg/ml en un medio carente de nitrógeno durante 90 min. Transcurrido este tiempo se añadió 0.5 mM de nitrito para analizar su desaparición en el tiempo en las cepas WT (●), $\Delta yn r 1$ (○), $\Delta ssu 1$ (▼), $\Delta ssu 2$ (Δ) e $\Delta yn r 1 \Delta ssu 2$ (■).

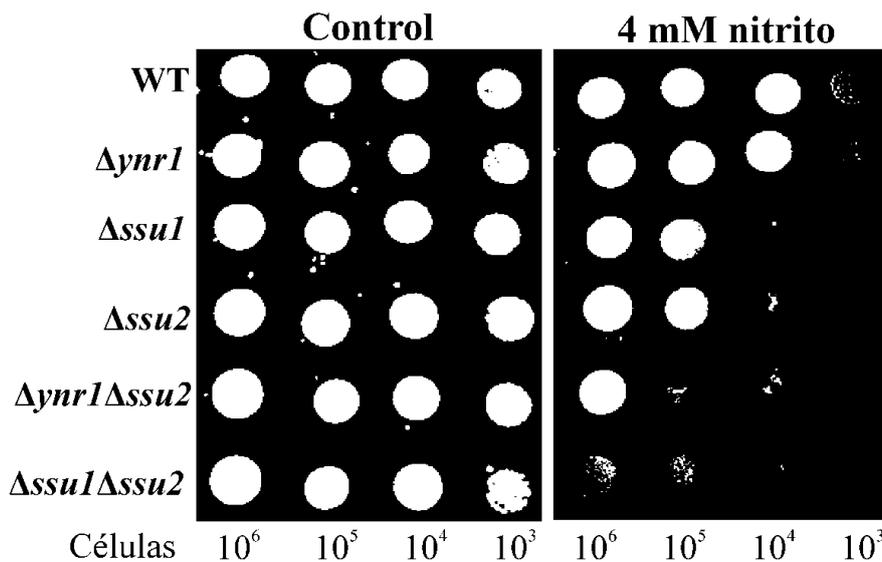


Figura 19. La interrupción de *SSU1* y *SSU2* confiere sensibilidad a nitrito. Diluciones seriadas de las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios con 4 mM de nitrito sódico más 1 mM de prolina, tamponados a pH 5 con 50 mM de MES-Tris. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días.

El aumento en el consumo de nitrito que presenta $\Delta ynr1\Delta ssu2$ podría explicar el fenotipo de sensibilidad a nitrito observado (Fig. 19). No olvidemos que aunque el nitrito sea un intermediario de la vía de asimilación de nitrato, no deja de ser un elemento tóxico.

1.3. Ssu2 está implicado en la excreción de nitrato y no de nitrito.

1.3.1. El mutante $\Delta ssu2$ acumula nitrato y no nitrito.

Una vez observado que los fenotipos del mutante $\Delta ssu2$ eran más relevantes que los de la cepa $\Delta ssu1$, decidimos centrar nuestro análisis en Ssu2. Así, medimos la acumulación intracelular de nitrato en $\Delta ssu2$ y $nSSU2$ con el gen de la nitrato reductasa deletado para evitar la reducción del nitrato (Fig. 20). La acumulación intracelular de nitrato en el mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$ era mayor que en la cepa $\Delta ynr1$, y mucho más bajos en la cepa portadora de varias copias de $SSU2$.

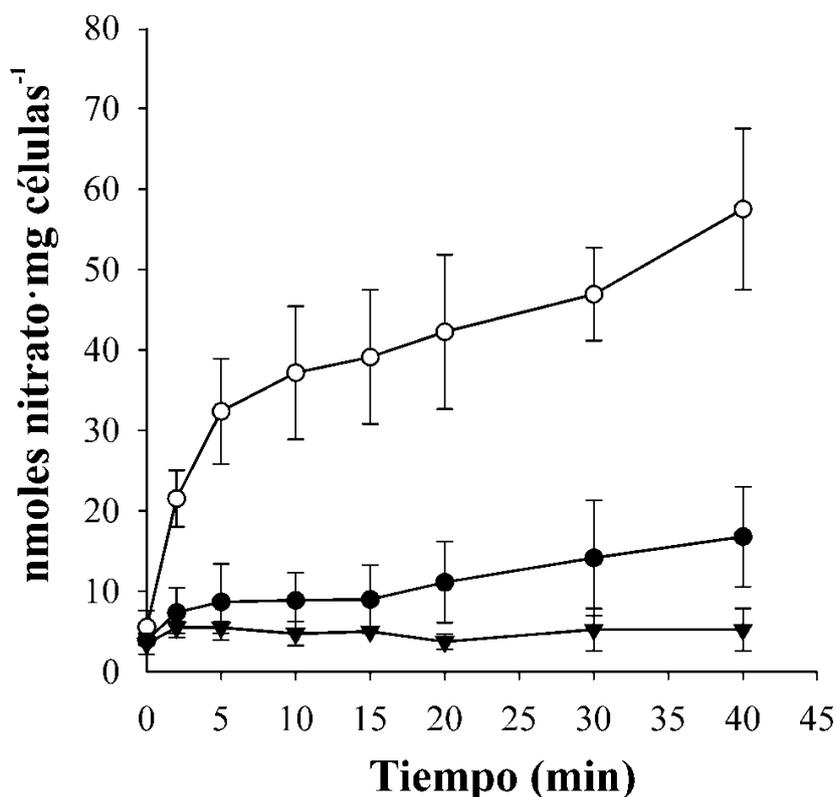


Figura 20. $\Delta ynr1\Delta ssu2$ acumula nitrato. Células crecidas en amonio, se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Transcurrido este tiempo se añadió 1 mM de nitrato y se tomaron muestras para analizar el contenido intracelular de nitrato en las cepas $\Delta ynr1$ (●), $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (○) e $\Delta ynr1nSSU2$ (▼).

Tras determinar que la cepa $\Delta ynr1\Delta ssu2$ acumulaba nitrato, decidimos estudiar si era capaz de excretarlo, pues si Ssu2 excretara nitrato, la cepa carente de este gen, debería ser incapaz de hacerlo. Para ello cargamos las células de nitrato durante 60 minutos, las transferimos a un medio sin fuente nitrogenada y analizamos la acumulación intracelular de nitrato (Fig. 21). En el doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$ no se observa flujo de nitrato al medio, pues los valores de nitrato en su interior permanecían relativamente invariables y altos en comparación a la cepa $\Delta ynr1$, donde nuevamente no se observaba acumulación de nitrato. Estos resultados ya nos indicaban que Ssu2 era capaz de excretar nitrato.

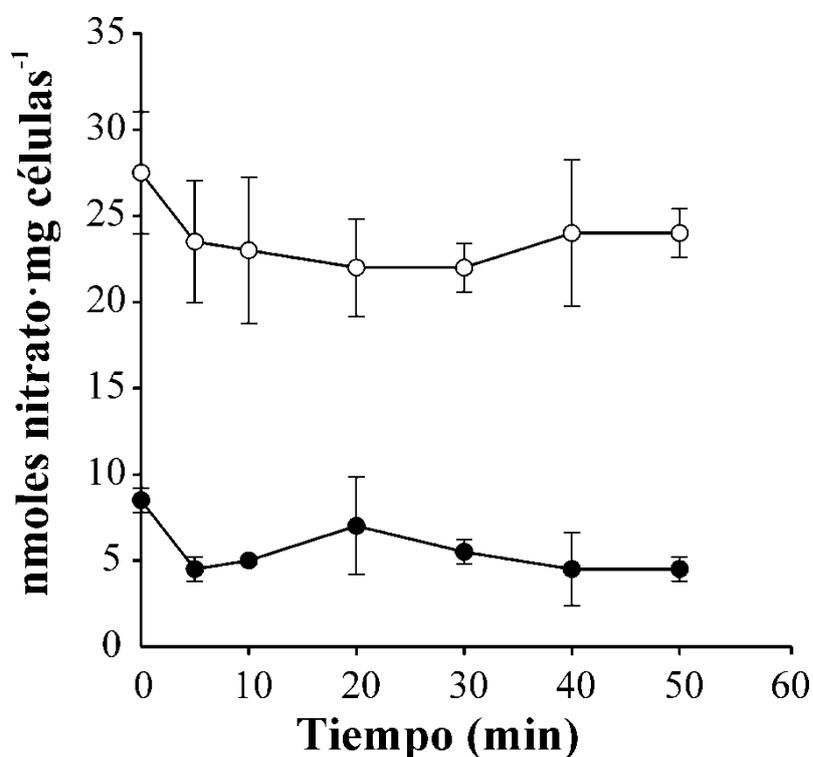


Figura 21. La excreción de nitrato está reducida en $\Delta ynr1\Delta ssu2$. Las células crecidas en 5 mM de amonio, se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno (YG) durante 120 min, para luego añadirle 1 mM de nitrato durante 60 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron y se resuspendieron en YG y se tomaron muestras para analizar el contenido intracelular de nitrato en $\Delta ynr1$ (●) e $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (○).

Los resultados de consumo y excreción de nitrito nos indicaban que Ssu2 no era capaz de excretar nitrito. Sin embargo, decidimos medir la acumulación intracelular de nitrito en los mutantes $\Delta ssu2$ y $nSSU2$ pero ahora carentes del gen de la nitrito reductasa. Como se recoge en la figura 22 se observa un ligero incremento en la acumulación de nitrito en la cepa $\Delta ynr1\Delta ssu2$ con respecto al mutante $\Delta ynr1$. Este ligero

incremento en la acumulación intracelular de nitrito en $\Delta yni1\Delta ssu2$ puede deberse a un aumento en la inducción de los genes de la vía de asimilación consecuencia de la interrupción de *SSU2*, que al final produciría una mayor entrada de nitrito. No obstante, puede que el aumento de la inducción del mutante $\Delta ssu2$ nos enmascare los resultados, y por estudiamos las propiedades de *Ssu2* en un sistema heterólogo.

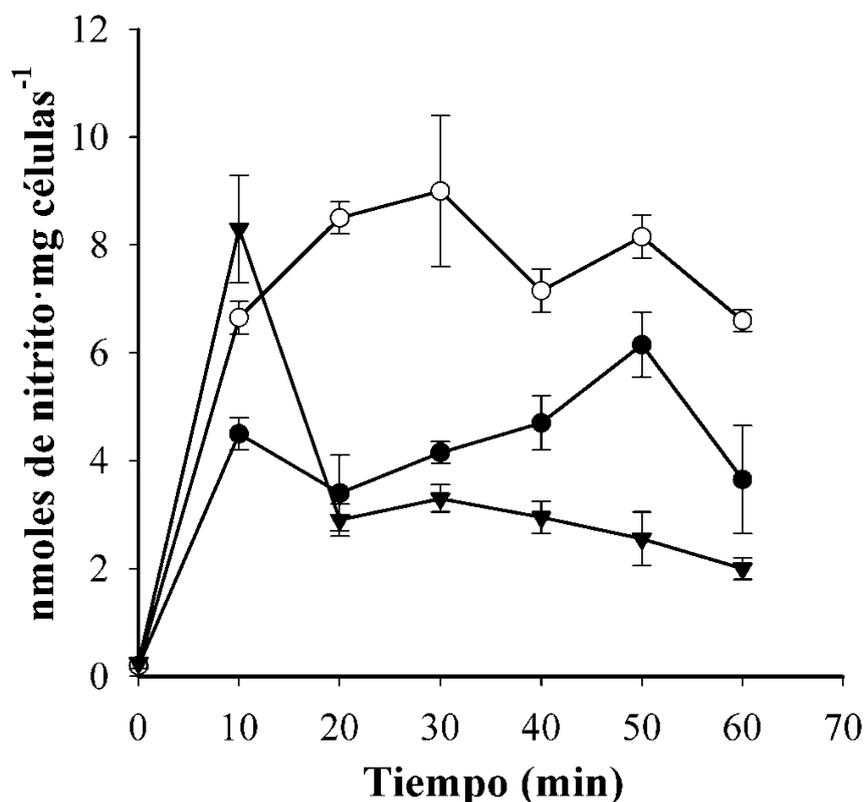


Figura 22. Acumulación intracelular de nitrito. Las células se crecieron en 5 mM de amonio y se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Transcurrido este tiempo se añadió 1 mM de nitrito y se tomaron muestras para analizar el contenido intracelular de nitrito en $\Delta yni1$ (●), $\Delta yni1\Delta ssu2$ (○) e $\Delta yni1nSSU2$ (▼).

1.3.2. *Ssu2* excreta nitrato y no nitrito en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Paralelamente, y en colaboración con Diego Álvarez y Teresa Giráldez (Universidad de La Laguna) expresamos *Ssu2* en ovocitos de *Xenopus laevis*, con el fin de demostrar que efectivamente *Ssu2* es capaz de excretar nitrato y confirmar si excretaba o no nitrito. *Xenopus* es un sistema de expresión ampliamente utilizado para la expresión y caracterización de canales y proteínas transportadoras de numerosos organismos [202]. Así, después de sintetizar el ARNc de *SSU2*, que en este caso estaba fusionado a la proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), se inyectaron

ovocitos con diferentes concentraciones de ARNc. Determinamos, en primer lugar, que Ssu2 se expresa y se localiza en la membrana del ovocito (Fig. 23A), confirmando la localización de Ssu2 en la membrana plasmática.

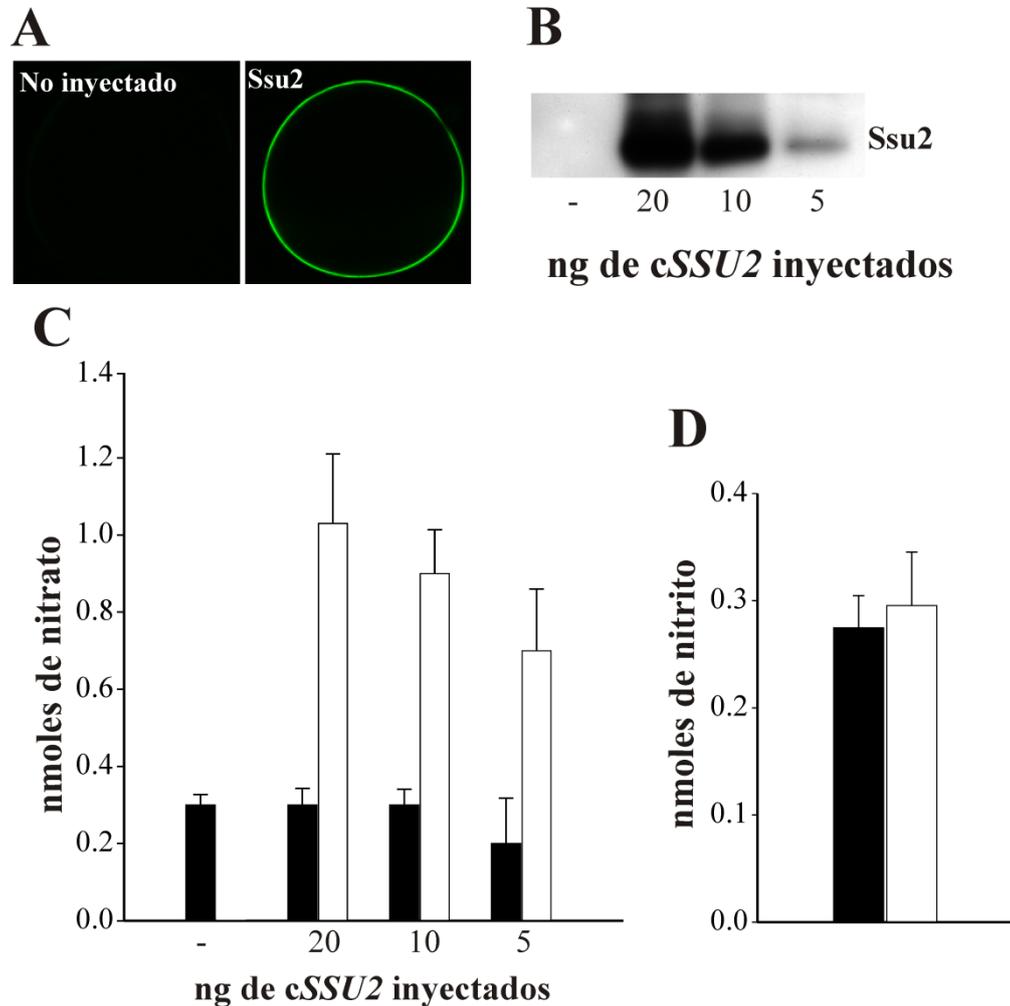


Figura 23. Ssu2 excreta nitrato en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos se inyectaron con diferentes concentraciones de Ssu2-YFP y se incubaron durante 7 días a 17°C. **A.** Ssu2-YFP se localiza en la membrana plasmática de los ovocitos. **B.** Ssu2 se expresa solamente en los ovocitos inyectados. La cantidad de Ssu2-YFP que se expresa es proporcional a los ng de cRNA inyectados. **C.** Se inyectaron ovocitos expresando (barras blancas) o no (barras negras) diferentes concentraciones de Ssu2-YFP con 0,9 nmoles de nitrato potásico y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para luego medir el nitrato del medio. **D.** Se inyectaron ovocitos expresando (barras blancas) o no (barras negras) Ssu2-YFP con 0,4 nmoles de nitrito sódico y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para luego medir el nitrito del medio.

También determinamos que los ovocitos que expresan Ssu2-YFP excretan nitrato y que existe una correlación positiva entre la cantidad de Ssu2-YFP que se expresa en la membrana con la cantidad de nitrato excretado (Fig. 23B y C). Los

ensayos con nitrito mostraron que Ssu2 no excretaba nitrito (Fig. 23D). Esta técnica supuso una potente herramienta para el estudio de otros transportadores de *H. polymorpha*, muy útil para nuestro grupo de investigación.

1.3.3. La cepa $\Delta ynr1$ acumula nitrato en presencia de sulfito.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, parece que Ssu2 es capaz de excretar nitrato y sulfito. Es por ello que nos preguntamos acerca de la acumulación de nitrato en un mutante de la nitrato reductasa bloqueando la salida de nitrato con sulfito. Para ello incubamos el mutante $\Delta ynr1$ en medios con nitrato en presencia o no de sulfito (Fig. 24). Bajo estas condiciones en la cepa $\Delta ynr1$ se produce una acumulación transitoria de nitrato que no se observa en medios sin sulfito. Esta acumulación de nitrato se produce como consecuencia de la competencia que existe entre el nitrato y el sulfito por ser excretados vía Ssu2, de forma que una vez que el sulfito es en parte metabolizado y/o excretado, el nitrato es entonces eliminado de la célula a través de esta permeasa.

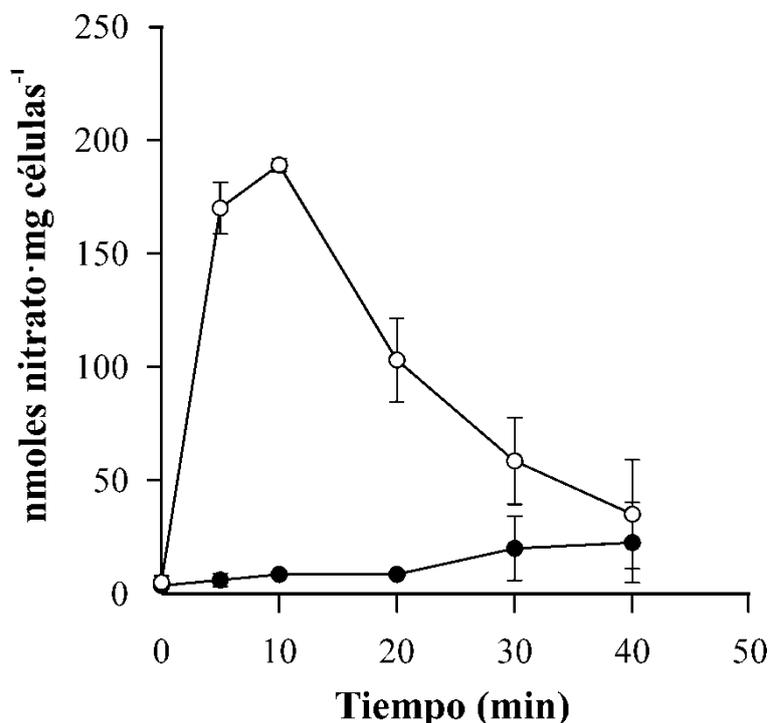


Figura 24. El mutante $\Delta ynr1$ acumula nitrato en presencia de sulfito. Células crecidas en 5 mM de amonio, se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Transcurrido este tiempo se añadió 0,75 mM de nitrato en presencia (○) o no de 2 mM de sulfito (●) y se tomaron muestras para analizar la concentración intracelular de nitrato.

Este resultado es consistente con nuestra hipótesis de que el transporte de nitrato es independiente de la presencia de la nitrato reductasa, ya que observamos consumo de nitrato en $\Delta ynr1$ mutando *SSU2* o bloqueando la salida de nitrato con sulfito.

Hay que destacar que los valores de acumulación que se alcanzan en la cepa $\Delta ynr1$ con nitrato más sulfito son superiores a los obtenidos para la acumulación de nitrato en el doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$. Estos experimentos sugerían que el posible responsable de esta discrepancia fuera *Ssu1*. Sin embargo, tras analizar la acumulación de nitrato en el triple mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2\Delta ssu1$ y obtener valores similares que en $\Delta ynr1\Delta ssu2$, descartamos que fuera *Ssu1* el responsable principal de este incremento en la acumulación de nitrato (Fig. 25). No obstante, no descartamos la existencia de otras proteínas de membrana responsables de excretar nitrato. De hecho, tenemos evidencias que apuntan a *HpNar1* como responsable de tal incremento (Rafaela González, GMN, datos no mostrados).

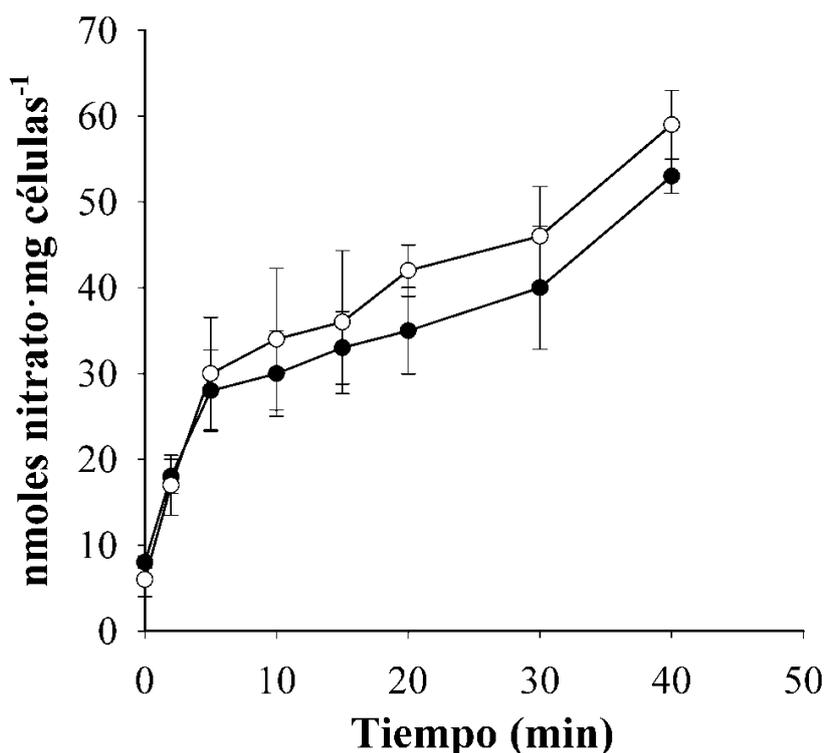


Figura 25. La acumulación intracelular de nitrato aumenta ligeramente en la cepa $\Delta ynr1\Delta ssu1\Delta ssu2$. Células crecidas en 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml y se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Transcurrido este tiempo se añadió 1 mM de nitrato y se tomaron muestras para analizar el contenido intracelular de nitrato en $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (●) e $\Delta ynr1\Delta ssu1\Delta ssu2$ (○).

Acorde con los resultados de competencia nitrato-sulfito mostrados anteriormente, observamos como en presencia de nitrato existe un incremento en la sensibilidad a sulfito del WT y del mutante $\Delta ssu1$ (Fig. 26). Este resultado puede explicarse de igual forma que en el caso anterior, porque el nitrato y el sulfito compiten por ser excretados a través de Ssu2, de forma que al excretar Ssu2 nitrato y no sulfito, éste se acumulaba en su interior causando este aumento de sensibilidad.

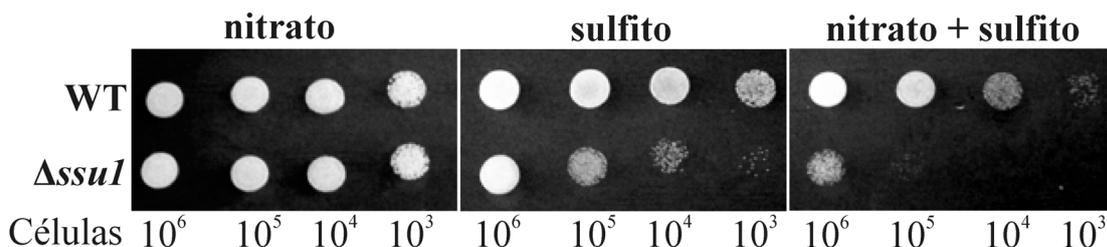


Figura 26. La sensibilidad a sulfito se incrementa cuando se añade nitrato al medio. Diluciones seriadas de las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios con 10 mM de nitrato sódico más 1mM de prolina, 3 mM de sulfito más 5 mM de amonio y 10 mM de nitrato más 3 mM de sulfito y 1 mM de prolina, tamponados a pH 3.5 con 75 mM de ácido tartárico-Tris. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días.

1.3.4. La cepa $\Delta ssu2$ es sensible a clorato.

También nos pareció oportuno explorar si Ssu2 era capaz de excretar clorato, el análogo estructural del nitrato, el cual resulta tóxico para los organismos asimiladores de nitrato debido a su reducción a clorito por acción de la nitrato reductasa. El clorato ha sido usado tradicionalmente para aislar genes involucrados en la asimilación de nitrato. Por lo general, la mayoría de los mutantes obtenidos mediante esta estrategia han estado afectados bien en la nitrato reductasa, o en genes reguladores positivos. Pero hay al menos dos casos donde esta estrategia permitió identificar transportadores de nitrato, el caso de CRNA en *A. nidulans* [37] y el de CHL1 en *A. thaliana* [295]. Para testar si Ssu2 era capaz de excretar clorato y/o clorito estudiamos la sensibilidad de las cepas $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ en presencia de diferentes concentraciones de este anión tóxico (Fig. 27). La cepa $\Delta ssu2$ presentaba una alta sensibilidad a clorato mucho mayor que la observada en el mutante $\Delta ssu1$. Estos resultados aunque parecen indicar la capacidad de Ssu2 y en menor medida de Ssu1 por excretar clorato y/o clorito, no podemos descartar que este aumento en la sensibilidad a clorato sea producido por un aumento en la actividad nitrato reductasa, consecuencia del incremento de la acumulación intracelular

de nitrato del mutante $\Delta ssu2$.

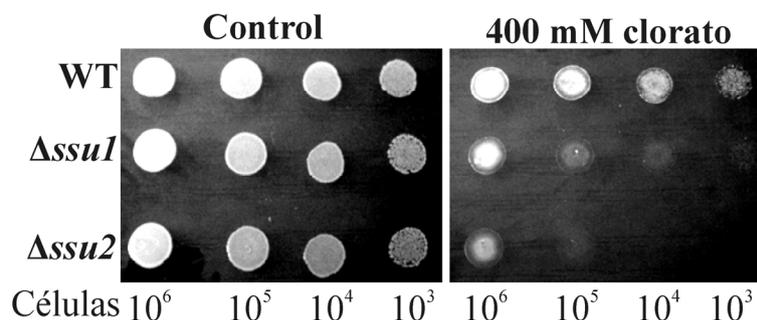


Figura 27. Sensibilidad a clorato de $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$. Las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios con 5 mM de nitrato más 1 mM de amonio y clorato potásico a la concentración indicada. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días.

1.4. El nitrito y no el nitrato inducen la expresión de *SSU2*.

En *S. cerevisiae* la expresión de *SSU1* no solamente responde a sulfito sino a óxido nítrico y nitrito. Esto podría indicar que además de excretar sulfito, excrete intermediarios nitrogenados reactivos e incluso el propio nitrato procedente de la reducción del NO por parte de las hemoglobinas [261]. En plantas se ha observado que otra fuente de generación de óxido nítrico es la nitrato reductasa, la cual bajo determinadas condiciones es capaz de catalizar la reducción del nitrito a óxido nítrico [246]. Para determinar si la expresión de *SSU1* y *SSU2* era dependiente de la fuente nitrogenada se utilizaron dos estrategias: 1) qRT-PCR; y 2), fusión de *SSU2* al gen reportero *lacZ* (*SSU2-lacZ*). La expresión de *SSU1* y *SSU2* en una cepa WT es dependiente de la fuente nitrogenada (Fig. 28). La expresión de *SSU1* y *SSU2* es mayor en nitrato con respecto a amonio, siendo mayor la expresión de *SSU2* en nitrato que la del gen *SSU1*. Además a medida que se aumenta la cantidad de nitrato, los valores de expresión de *SSU1* y de *SSU2* también lo hacen. Estos valores de expresión son todavía mayores cuando tras inducir las células 2 horas en 10 mM de nitrato le añadimos 2 mM de nitrito durante 1 hora. Además, que en presencia de prolina no se produjera un aumento significativo de la expresión de *SSU1* y *SSU2*, indicaba que estos genes no respondían a cualquier tipo de fuente no preferente sino a nitrato, nitrito y/o óxido nítrico. Tanto el nitrato como el nitrito parecían inducir estos genes, no podíamos descartar entre el nitrato y el nitrito como posibles inductores de la expresión de *SSU1* y *SSU2*, pues en los medios con nitrato se produce nitrito. El hecho de que la inducción de

SSU2 aumentara tras la adición de nitrito nos indicaba que tanto el nitrito como el posible óxido nítrico producido por la nitrato reductasa podrían estar implicados en la inducción de la expresión de este gen y no tanto el nitrato.

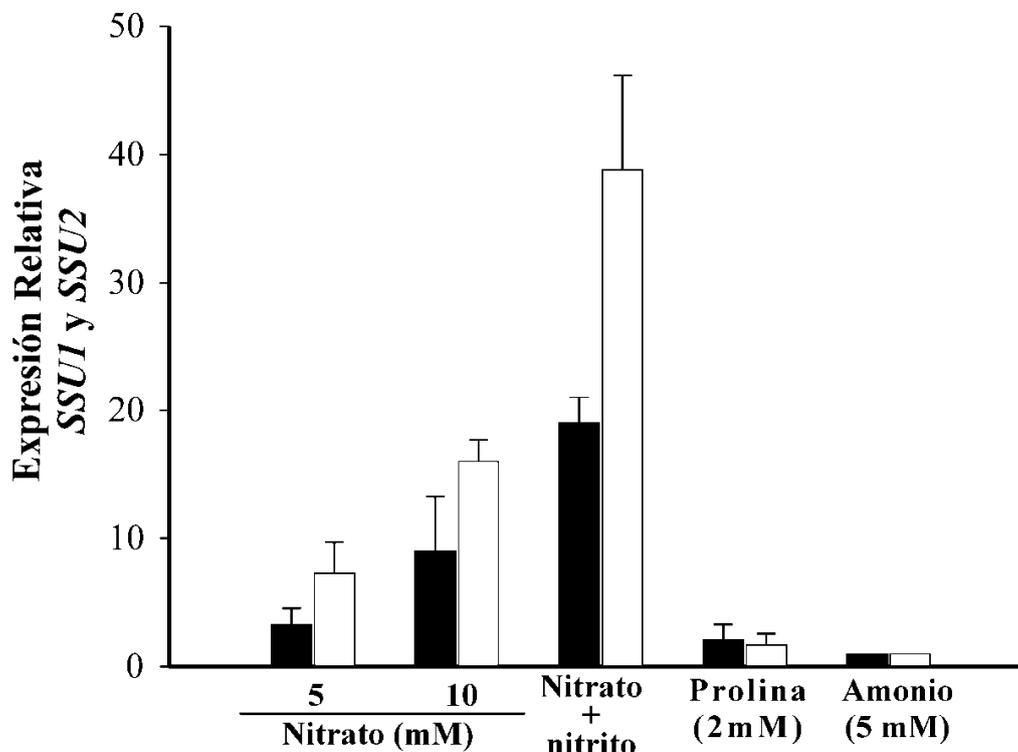


Figura 28. Expresión relativa de *SSU1* y *SSU2*. La expresión de *SSU1* (barras negras) y *SSU2* (barras blancas) se determinó mediante qRT-PCR tras la incubación de una cepa WT durante 2 horas en las condiciones indicadas. Las células que se resuspendieron en nitrato (10 mM) más nitrito (2 mM), se incubaron en nitrato durante 2 h, para luego añadirles nitrito durante 1 h. Se usó la actina como control interno. Se muestran los datos \pm D.E. de tres experimentos independientes.

Sin embargo, no parecía que fuera el nitrato el principal inductor de la expresión de *SSU2*, porque mientras que en una cepa silvestre portadora de la construcción *SSU2-lacZ*, la expresión en nitrato con respecto a amonio era del orden de 4 veces mayor, en la cepa $\Delta ynr1P_{SSU2-lacZ}$ no se observó una inducción significativa (Fig. 29A). Para estudiar si los inductores de la expresión serían el nitrito y/o el óxido nítrico, estudiamos la expresión en la cepa $\Delta ssu2P_{SSU2-lacZ}$ en nitrato, ya que bajo estas condiciones acumula nitrato y en consecuencia, excreta grandes cantidades de nitrito. Se puede comprobar en la figura 29B como la expresión de *SSU2* es superior en el mutante $\Delta ssu2$ con respecto al WT.

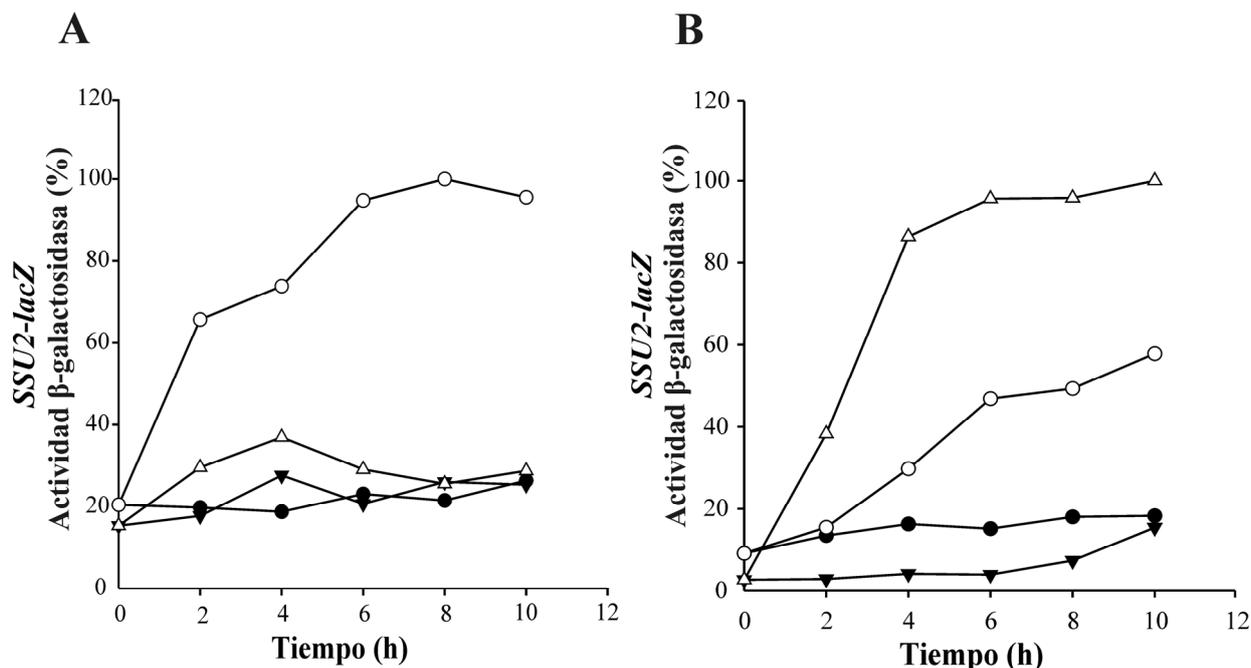


Figura 29. Niveles de expresión de *SSU2*. Células crecidas hasta saturación en YPD y portadoras de la construcción *SSU2-lacZ* fueron resuspendidas a una concentración de 3 mg/ml en los distintos medios. Los ensayos fueron repetidos 3 veces sin variaciones significativas. **A.** Las células fueron crecidas en 5 mM de amonio y en 5 mM de nitrato más 0.5 mM de prolina. A los tiempos indicados se tomaron muestras para medir la actividad β -galactosidasa en WT en amonio (●), WT en nitrato (○), $\Delta ynr1$ en amonio (Δ) e $\Delta ynr1$ en nitrato (▼). El 100% de actividad se corresponde a valores de 841 nmoles *o*-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹. **B.** Las cepas WT *P_{SSU2}-lacZ* y $\Delta ssu2$ *P_{SSU2}-lacZ* se resuspendieron en 5 mM de amonio y en 5 mM de nitrato durante 10 horas. WT en amonio (●), WT en nitrato (○), $\Delta ssu2$ en amonio (▼) y $\Delta ssu2$ en nitrato (Δ). El 100% de actividad se corresponde a valores de 2141 nmoles *o*-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹.

Para discriminar entre el papel del nitrito y el del óxido nítrico como inductores de *SSU2*, llevamos a cabo los experimentos en el mutante del gen *YNRI*, en principio incapaz de producir óxido nítrico (Fig. 30). Bajo estas condiciones se observa por qRT-PCR que el nitrito induce la expresión de *SSU2* casi 10 veces con respecto a amonio, mientras que el nitrato solamente aumenta la expresión 2 veces con respecto a amonio. El sulfito no parece provocar un aumento significativo de la expresión de estos genes, pues según se desprenden de los datos de qRT-PCR, la expresión de *SSU2* es ligeramente superior en sulfito con respecto al control sin sulfito (casi 2 veces más) pero la del gen *SSU1* es similar a la obtenida en amonio. En definitiva, nuestros datos indican que el nitrito es la señal que induciría la expresión de *SSU2* y no el posible óxido nítrico producido. Efectivamente esto parece indicar que aunque *Ssu2* excreta nitrato, es el nitrito el que induce su expresión. De esta forma, cuando hay mucho nitrito resultado de

la reducción del nitrato, se induciría *SSU2* para excretar nitrato y reducir así, los niveles de nitrito producido y evitar los efectos tóxicos de este intermediario metabólico.

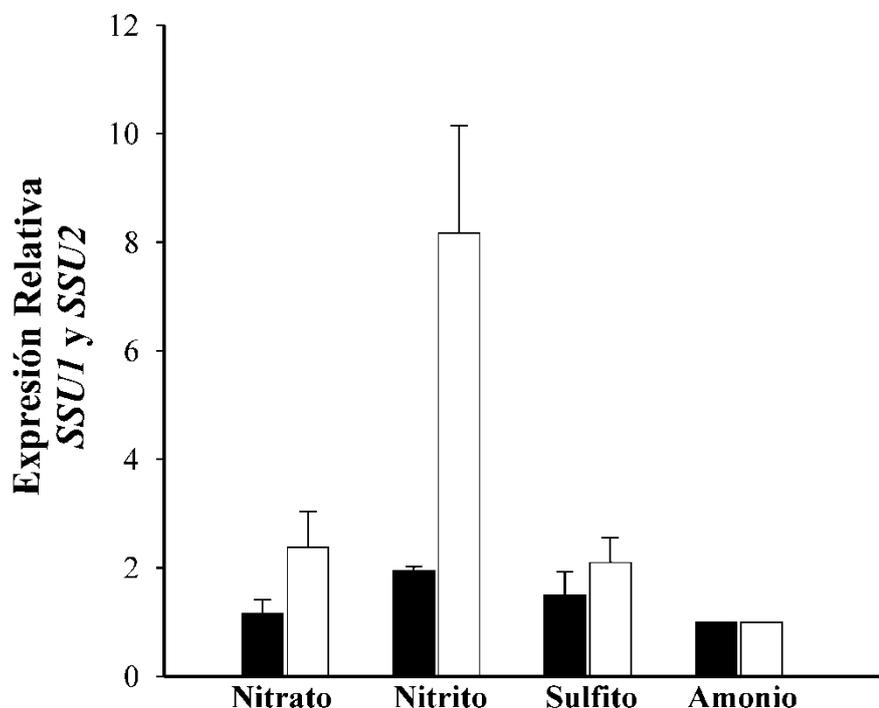


Figura 30. Expresión relativa de *SSU1* y *SSU2* en el mutante $\Delta ynr1$. La expresión de *SSU1* (barras negras) y *SSU2* (barras blancas) se determinó por PCR a tiempo real tras la incubación del mutante $\Delta ynr1$ durante 2 horas en medios con 5 mM de nitrato, 2 mM de nitrito, 2 mM de sulfito más 5 mM de amonio y 5 mM de amonio, tamponados a pH 5 con 50 mM de MES-Tris, salvo el medio con sulfito que fue tamponado a pH 3.5 con 75 mM de ácido tartárico-Tris. Se usó la actina como control interno. Se representan los valores medios de tres experimentos independientes \pm la D.E.

El análisis bioinformático de *Ssu2* y todos los ensayos funcionales realizados indicaban que se trataba de una proteína localizada en la membrana plasmática. Con el fin de estudiar la localización celular de *Ssu2* fusionamos la proteína verde fluorescente eGFP (“*enhanced Green Fluorescent Protein*”) al extremo C-terminal de esta permeasa. La funcionalidad de esta construcción se comprobó mediante ensayos de sensibilidad a sulfito. Seguidamente analizamos la localización de la fluorescencia en la cepa portadora de esta construcción y comprobamos que la fluorescencia se localizaba preferentemente en la superficie celular, aunque parte de la proteína presentaba localización perinuclear. En la imagen de superposición se puede observar como la fluorescencia de la GFP rodea al núcleo teñido. Suponemos que esto ocurre porque parte de *Ssu2*-GFP queda retenida en el retículo endoplasmático (Fig. 31).

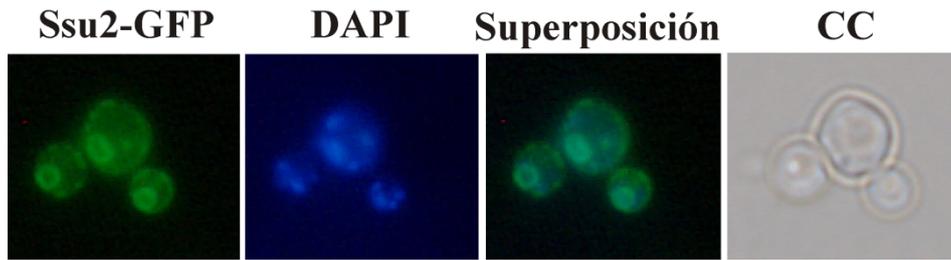


Figura 31. Ssu2 se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática. Localización celular de la proteína de fusión Ssu2-GFP en células incubadas en amonio durante 120 min. El ADN fue teñido con DAPI. El panel de la derecha muestra la superposición de la localización de Ssu2-GFP y el núcleo. CC (campo claro).

Además comprobamos que aunque en medios con amonio existe expresión de Ssu2, los niveles de proteína en la superficie celular se incrementan cuando las células se crecen en nitrato y en nitrato más nitrito. El sulfito en cambio, no parece producir un aumento significativo en la cantidad de Ssu2 que se localiza en la membrana (Fig. 32). Estos mismos resultados se obtienen en inmunoblots de células portadoras de la construcción Ssu2-GFP crecidas en 10 mM de nitrato y en 10 mM de nitrato más 2 mM de nitrito (Fig. 33).

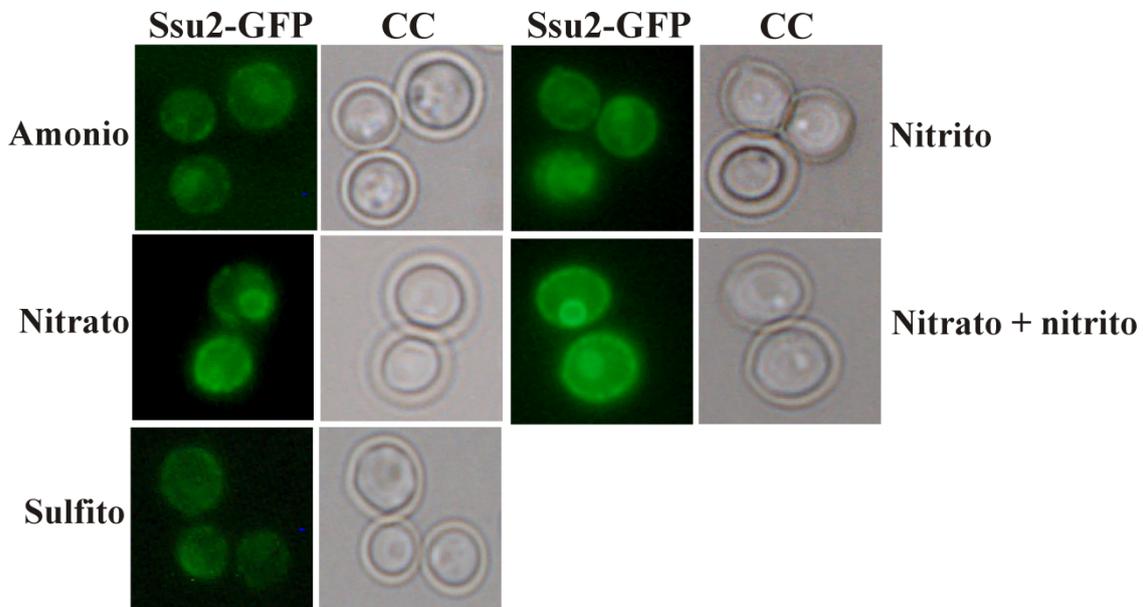


Figura 32. Localización celular de Ssu2-GFP. Las células se crecieron en YPD y fueron resuspendidas a una concentración de 3 mg/ml en 5 mM de amonio, 2 mM de sulfito, 10 mM de nitrato, 2 mM de nitrito y 10 mM de nitrato más 2 mM de nitrito. Se recogieron muestras a las 4 h para las imágenes de fluorescencia. Todos los medios fueron tamponados a pH 5.5 (50 mM MES-Tris), salvo el de sulfito que se tamponó a pH 3.5

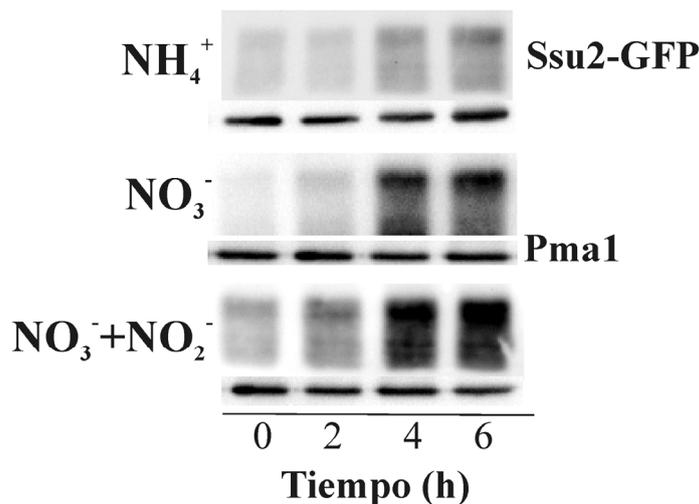


Figura 33. Niveles de Ssu2. Para realizar el Inmunoblot de Ssu2-GFP, las células crecidas en YPD fueron resuspendidas a una concentración de 3 mg/ml en en 5 mM de amonio, 10 mM de nitrato y 10 mM de nitrato más 2 mM de nitrito, tamponadas a pH 5.5 (50 mM MES-Tris). Pma1 se usó como control de carga.

La cantidad de Ssu2 aumenta en medios con nitrato más nitrito con respecto a medios con amonio. De esta forma, parece que es el nitrito el principal inductor de la expresión de *SSU2* y por tanto, los niveles de Ssu2 son mayores en tales condiciones.

1.5. Ssu2 es esencial para mantener el crecimiento y la viabilidad de las células en nitrato.

1.5.1. La cepa $\Delta ssu2$ crece deficientemente en nitrato.

Durante el crecimiento en nitrato se generan una serie de intermediarios tóxicos para las células. Las células creciendo en nitrato transportan más nitrato del que son capaces de reducir a amonio, es por ello que excretan mucho del nitrito que producen. Así nos preguntamos qué efecto tendría para las células que crecen en nitrato el carecer de Ssu2, que efecto tendría esta acumulación intracelular de nitrato, y como consecuencia el aumento en la excreción de nitrito. Como se puede observar en la figura 34A, la tasa de crecimiento del mutante $\Delta ssu2$ es mucho menor a la del WT, tras 8 horas en nitrato, el crecimiento prácticamente se detiene, a diferencia del WT. Los mismos resultados de $\Delta ssu2$ se obtienen en el doble mutante $\Delta ssu1\Delta ssu2$. El comportamiento de $\Delta ssu1$ es similar al WT, salvo a partir de las 20 h en nitrato que es cuando el crecimiento de esta cepa empieza a retrasarse, poniendo en evidencia que es Ssu2 el que

protege en mayor medida, de la toxicidad generada por el nitrato y/o nitrito. Estas diferencias no existen cuando se crecen en amonio (Fig. 34B).

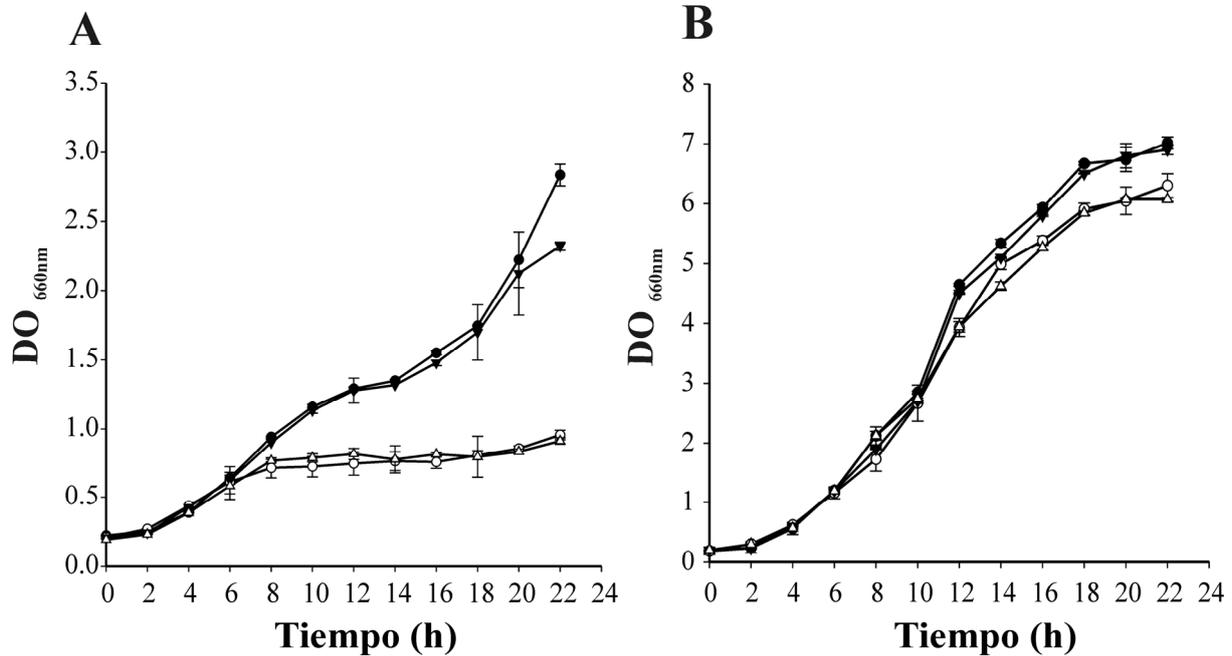


Figura 34. La delección de *SSU2* afecta al crecimiento en nitrato. Células crecidas previamente en YDP, se lavaron antes de ser inoculadas en 5 mM de nitrato (A) o en 5 mM de amonio (B) a una DO₆₆₀ = 0.2. WT (●), $\Delta ssu2$ (○), $\Delta ssu1$ (▼) y $\Delta ssu1\Delta ssu2$ (△).

1.5.2. $\Delta ssu2$ presenta una viabilidad celular reducida efecto del nitrito generado tras la reducción del nitrato.

Después de observar que el crecimiento en nitrato de la cepa $\Delta ssu2$ estaba severamente afectado, estudiamos cómo era la viabilidad celular del WT y del mutante $\Delta ssu2$ en amonio y en nitrato. La figura 35A recoge como la viabilidad celular de la cepa $\Delta ssu2$ tras 8 h en nitrato desciende un 60% a diferencia de lo que ocurre en el WT. Para descartar si el defecto en el crecimiento y viabilidad en nitrato que manifiesta $\Delta ssu2$ se debía a la acumulación intracelular de nitrato, al aumento de la producción de nitrito o a ambos procesos, estudiamos la viabilidad celular en el doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$ en nitrato, pues en estas condiciones no existe producción de nitrito pero si acumulación intracelular de nitrato.

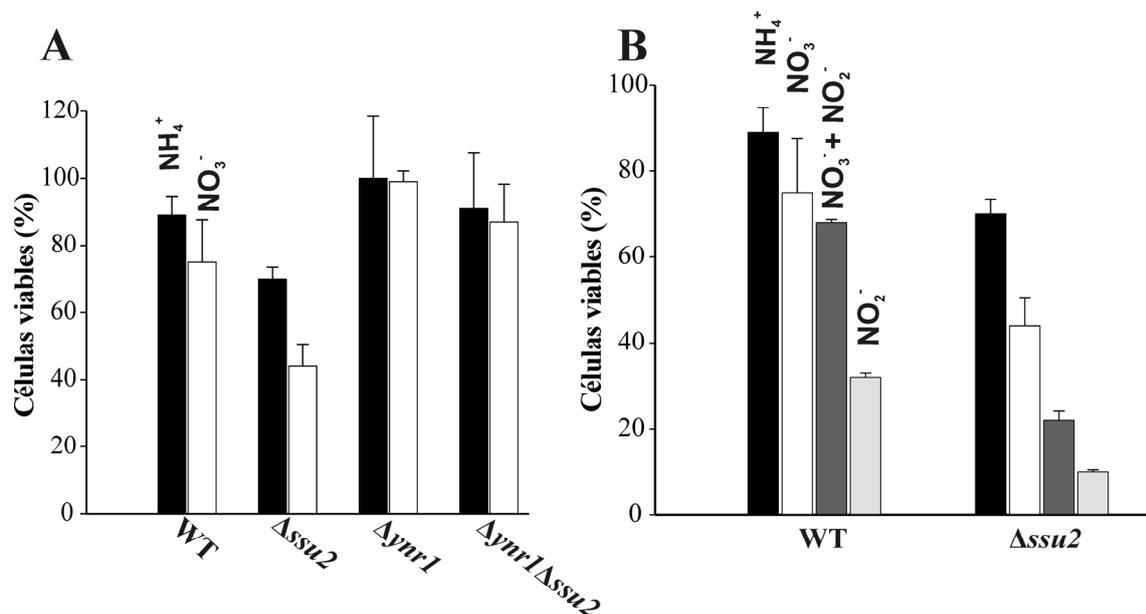


Figura 35. Ssu2 protege contra la toxicidad generada por el nitrato. Las células crecidas en 5 mM de amonio se resuspendieron a una concentración de 10 mg/ml en los distintos medios. **A.** Viabilidad celular de WT, $\Delta ssu2$, $\Delta ynr1$ e $\Delta ynr1\Delta ssu2$ tras 8 h de incubación en 5 mM de amonio (barras negras) y en 10 mM de nitrato (barras blancas). **B.** Se determinó la viabilidad en el WT y en la cepa $\Delta ssu2$ tras 8 h de incubación en 5 mM de amonio (barras negras), 10 mM de nitrato (barras blancas), 10 mM de nitrato más 0.25 mM de nitrito (barras grises oscuras) y por último en 0,6 mM de nitrito (barras grises claras).

La viabilidad del doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$ en nitrato es similar a la del mutante $\Delta ynr1$ (Fig. 35A), por lo tanto, descartamos que sea la acumulación intracelular de nitrato la responsable del descenso de la viabilidad celular de la cepa $\Delta ssu2$ en nitrato. Cuando los ensayos de viabilidad celular se realizan en nitrato más nitrito (Fig. 35B), la viabilidad celular del mutante $\Delta ssu2$ disminuye aún más. En medios con nitrito se observa que aunque el nitrito reduce la viabilidad celular incluso en el WT, esta disminución es mucho más rápida en el mutante $\Delta ssu2$ (Fig. 35B), porque en estas condiciones se produciría supuestamente óxido nítrico por reducción del nitrito, el cual sería transformado a nitrato por acción de la flavohemoglobina. La delección de *SSU2* impediría la excreción de este nitrato, el cual actuaría induciendo los genes de la vía y produciendo más nitrito. Todos estos resultados dan cuenta de la importancia que tiene Ssu2 para el correcto crecimiento y viabilidad en nitrato de *H. polymorpha*, protegiendo a la célula del efecto tóxico del nitrito. Estos datos de viabilidad se corresponden de forma cualitativa con la tinción de las células con el colorante vital azul tripán, el cual atraviesa la membrana de las células muertas tiñéndolas de un color azul característico (Fig. 36).

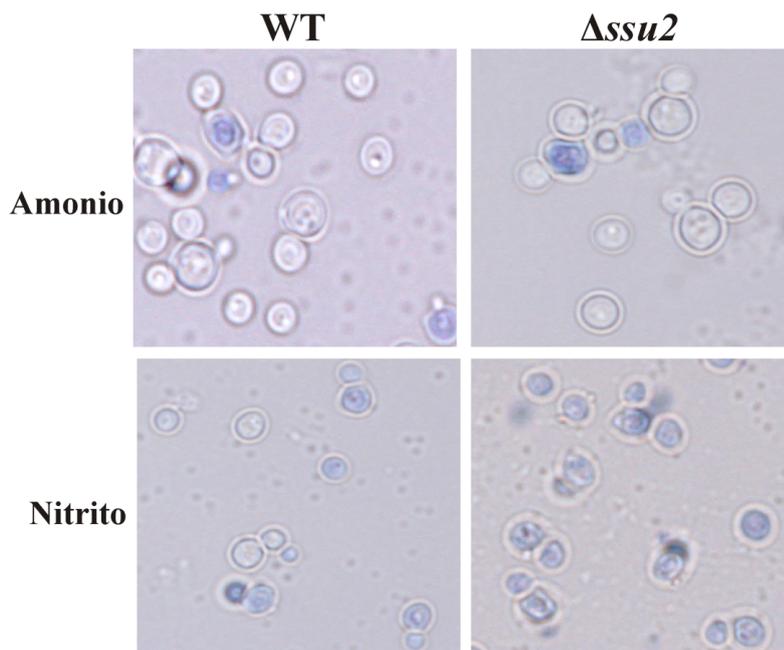


Figura 36. La cepa $\Delta ssu2$ es muy sensible a nitrito. Las células crecidas en 5 mM de amonio fueron resuspendidas a una concentración de 10 mg/ml en amonio (5 mM) y en nitrito (0.6 mM). Tras 10 h de incubación se tomaron muestras para teñir las células con azul tripán y visualizarlas al microscopio óptico con aumento de 100X. Se analizaron unas 100 células aproximadamente.

1.6. ScSsu1 es capaz de excretar nitrato y nitrito en *H. polymorpha*.

1.6.1. ScSsu1 excreta nitrato.

En nuestro afán por entender el papel que tenían las permeasas de sulfito en la excreción de nitrato y/o nitrito, nos planteamos si la capacidad de Ssu2 para excretar nitrato era una peculiaridad de *H. polymorpha* o también la presentaba Ssu1 de *S. cerevisiae*. Para abordar esta cuestión estudiamos si ScSSU1 era capaz de complementar funcionalmente al mutante $\Delta ssu2$, si la función de Ssu2 como sistema de excreción de nitrato no era algo único de *H. polymorpha*, sino que era capaz de mantenerse en ScSsu1 aún siendo ésta una levadura incapaz de asimilar nitrato. Así, expresamos ScSSU1 bajo el promotor de SSU2 para someterlo a los mismos mecanismos que alteran los niveles de expresión de SSU2, en un mutante $\Delta ssu2$. La cepa $\Delta ssu2$ transformada con ScSSU1, $\Delta ssu2$ ScSSU1 (se representan dos clones), era capaz de revertir el fenotipo de sensibilidad a sulfito (Fig. 37) revelando la funcionalidad de la construcción, ScSSU1 se expresaba en *H. polymorpha* y era capaz de revertir la sensibilidad a sulfito del mutante $\Delta ssu2$.

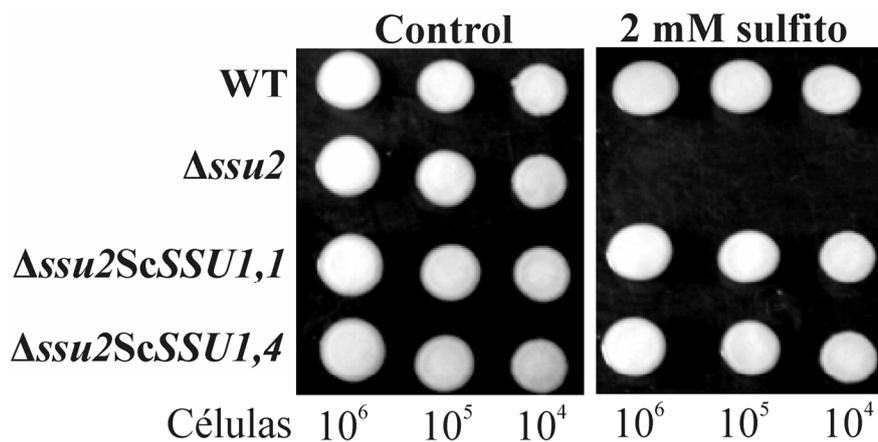


Figura 37. ScSSU1 es capaz de revertir la sensibilidad a sulfito del mutante Hp Δ Assu2. Las células crecidas en YPD, se sembraron por goteo en medios con 2 mM de sulfito sódico más 5 mM de amonio, tamponados a pH 3.5 con 75 mM de ácido tartárico-Tris. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días. Se muestran dos clones, Δ Assu2ScSSU1,1 y Δ Assu2ScSSU1,4.

Cuando analizamos el crecimiento en nitrato de estos transformantes observamos que casi no crecen (Fig. 38). Estas deficiencias en el crecimiento en nitrato que mostraban las cepas Δ Assu2ScSSU1 podían ser consecuencia de un reducido consumo de nitrato, porque presenten una alta tasa de excreción de nitrato y por ello sean incapaces de crecer en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. De hecho, el bajo consumo de nitrato que tienen estos transformantes (Fig. 39A) podría explicar el reducido crecimiento en nitrato que presentan. Las células que expresan ScSSU1 empiezan a consumir nitrato después de 1 hora de incubación, mientras que el mutante Δ Assu2 ya ha consumido prácticamente todo el nitrato del medio tras este tiempo.

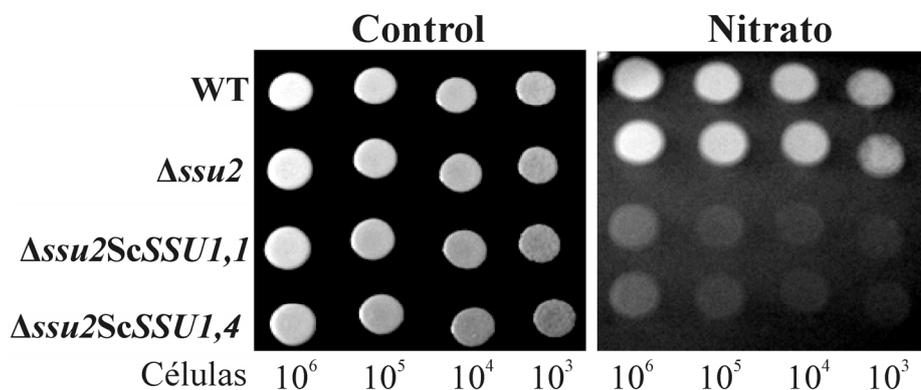


Figura 38. Δ Assu2ScSSU1 presenta un bajo crecimiento en nitrato. Las células crecidas en YPD, se sembraron por goteo en medios con 5 mM de nitrato. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días. Se muestran dos clones de Δ Assu2ScSSU1,1 y Δ Assu2ScSSU1,4.

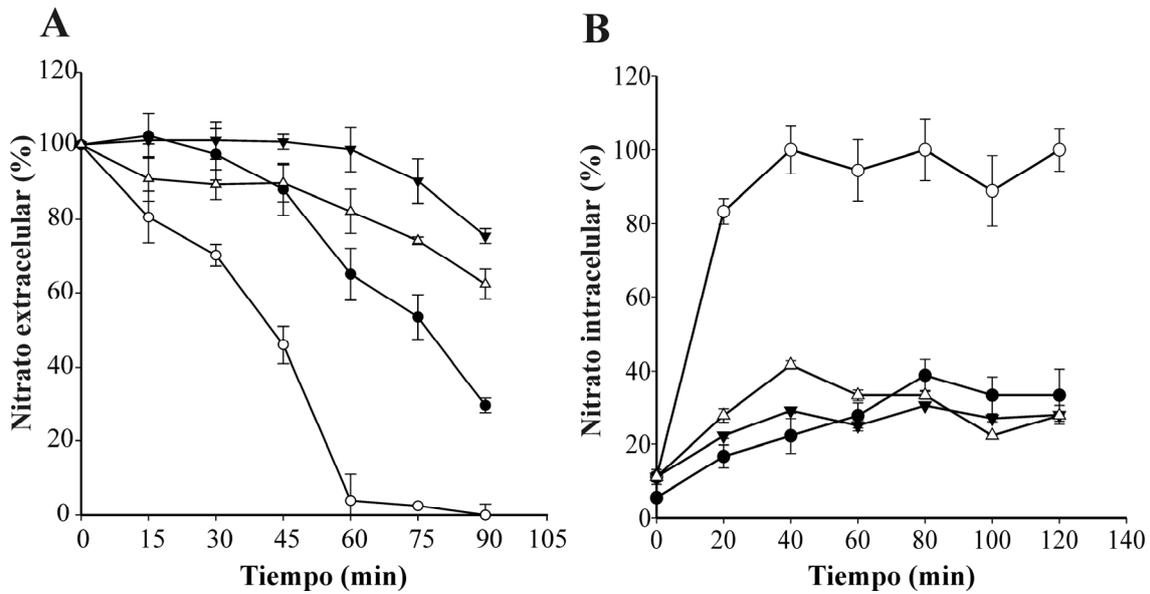


Figura 39. Las cepas $\Delta ssu2ScSSU1,1$ y $1,4$ presentan un reducido consumo y acumulación de nitrato. **A.** Células crecidas en amonio fueron sometidas a ayuno de nitrógeno durante 90 min. Transcurrido este tiempo se les añadió 0.5 mM de nitrato. WT (●), $\Delta ssu2$ (○), $\Delta ssu2ScSSU1,1$ (▼) y $\Delta ssu2ScSSU1,4$ (△). **B.** Las células se crecieron en 5 mM de amonio y se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Se añadió 1 mM de nitrato y se tomaron muestras para analizar la concentración intracelular de nitrato en $\Delta ynr1$ (●), $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (○), $\Delta ynr1\Delta ssu2ScSSU1,10$ (▼), $\Delta ynr1\Delta ssu2ScSSU1,23$ (△). 100% = 55 ± 1.4 nmoles de nitrato \cdot mg de células⁻¹.

Estos resultados indican que en lo referente a la asimilación de nitrato, muestran un comportamiento similar a la cepa *nSSU2*, en cuanto a un menor consumo de nitrato. Nos faltaba por analizar si al igual que *nSSU2* no acumulaban nitrato. Para ello interrumpimos el gen de la nitrato reductasa en las cepas $\Delta ssu2ScSSU1$. Tras realizar el ensayo pudimos comprobar cómo efectivamente estas cepas no eran capaces de acumular nitrato a diferencia del doble mutante $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (Fig. 39B). Estos resultados nos permiten afirmar que al igual que ocurre con *HpSsu2*, *ScSsu1* es capaz de excretar nitrato.

1.6.2. *ScSsu1* excreta nitrato.

En relación al consumo y acumulación intracelular de nitrato se obtuvieron los mismos resultados que para el nitrato. Las cepas $\Delta ssu2ScSSU1$ presentaban un consumo de nitrato (Fig. 40A) nulo en las condiciones ensayadas a diferencia de la cepa silvestre. Este hecho concuerda con los ensayos de acumulación intracelular de nitrato (Fig. 40B),

donde quedaba reflejado que ambos clones ($\Delta ssu2ScSSU1,1$ y $\Delta ssu2ScSSU1,4$) eran incapaces de acumular nitrito.

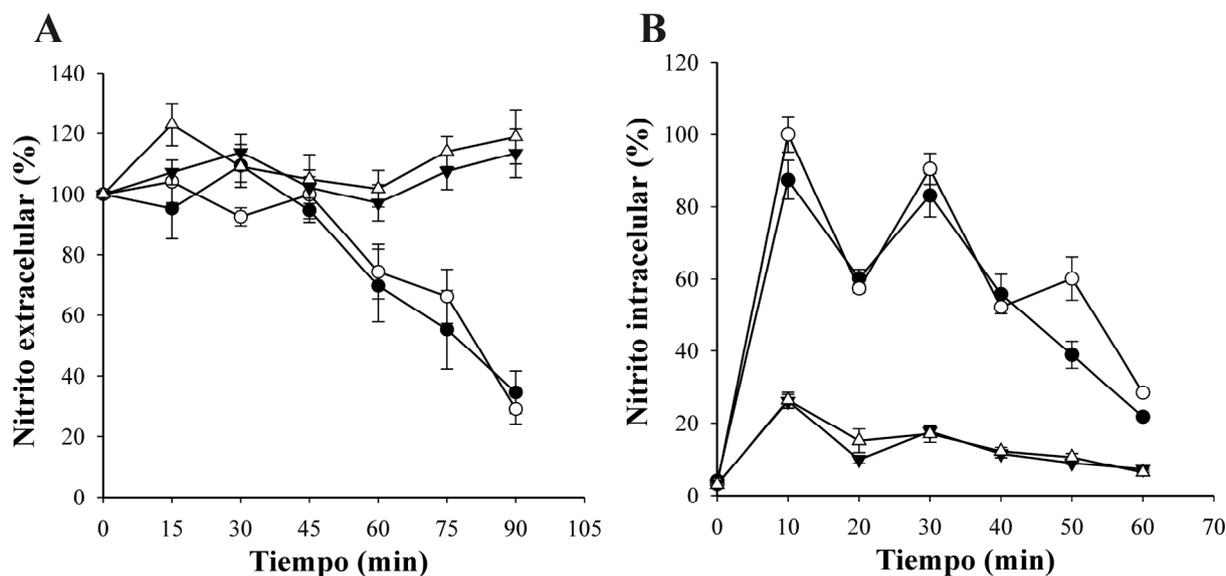


Figura 40. Los mutantes $\Delta ssu2ScSSU1$ no consumen ni acumulan nitrito. Las células se crecieron en 5 mM de amonio y se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Transcurrido este tiempo se añadió 0.5 mM de nitrito y se tomaron muestras para analizar la cantidad de nitrito en el medio de cultivo (A); o (B), se añadió 1 mM de nitrito para determinar la cantidad intracelular del mismo. WT (●), $\Delta ssu2$ (○), $\Delta ssu2ScSSU1,1$ (▼) e $\Delta ssu2ScSSU1,4$ (Δ). 100% = 38.5 ± 2.4 nmoles de nitrito \cdot mg de células⁻¹.

Estas cepas presentan una alta capacidad para excretar nitrito cuando se inducen en medios con nitrato, excretan hasta 10 veces más nitrito que una cepa WT (Fig. 41). Además la cinética de excreción de nitrito en los transformantes $\Delta ssu2ScSSU1$ también es diferente. La excreción de nitrito no desciende tras casi 4 horas de ensayo, todo lo contrario, sigue aumentando, mientras que en el WT y en la cepa $\Delta ssu2$ se dejaba de detectar nitrito en el medio pasadas 2 horas y tenían un pico máximo de excreción, que para el caso de la cepa $\Delta ssu2$ ocurría a los 60 minutos y para el WT sobre los 90-100 minutos y luego disminuía al ser consumido.

Otra de las pruebas que evidencian la capacidad de ScSsu1 de excretar nitrito se obtuvo transformando una cepa WT con el plásmido de expresión de ScSSU1. Estos transformantes que se caracterizaron por presentar un incremento en la cantidad de nitrito excretado, mostraban un descenso en la cantidad de nitrito intracelular y la excreción de este nitrito intracelular era mucho más rápida que en la cepa silvestre (Fig. 42).

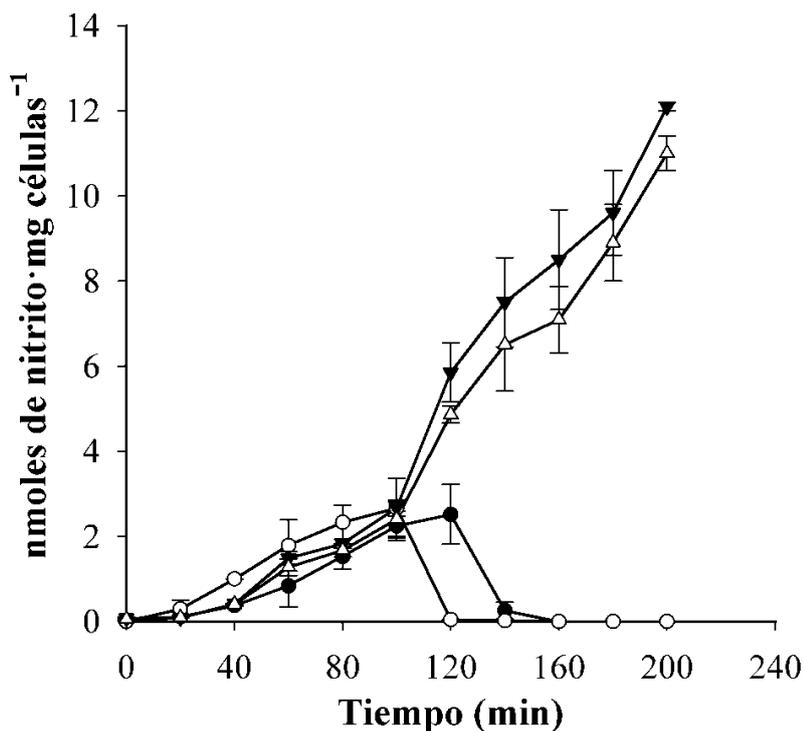


Figura 41. Los mutantes $\Delta ssu2ScSSU1$ excretan más nitrito que la cepa $\Delta ssu2$. Células crecidas en 5 mM de amonio se incubaron a una concentración de 10 mg/ml en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min. Transcurrido este tiempo se añadió 1 mM de nitrito y se tomaron muestras para analizar la concentración de nitrito en el medio en las cepas WT (●), $\Delta ssu2$ (○), $\Delta ssu2ScSSU1,1$ (▼) e $\Delta ssu2ScSSU1,4$ (Δ).

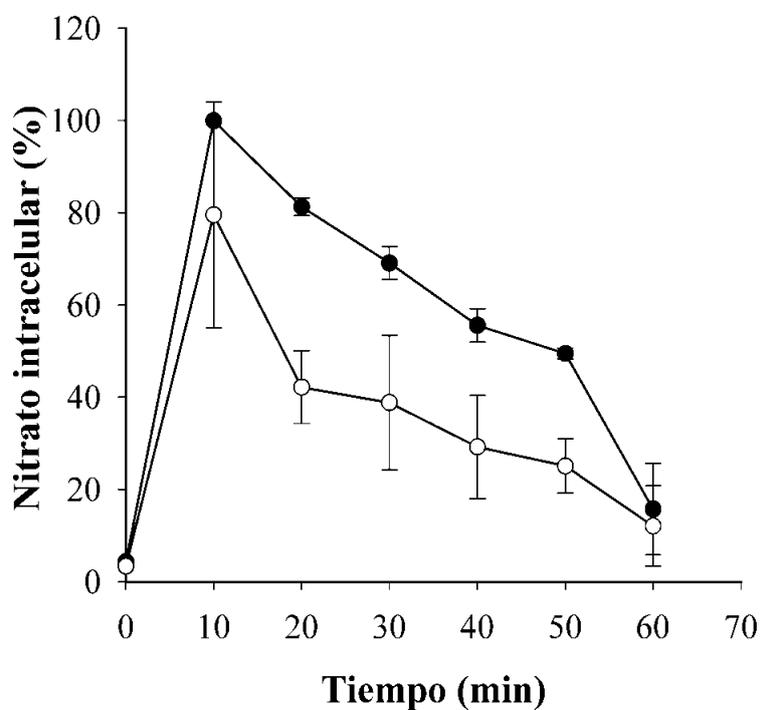


Figura 42. La cepa que expresa ScSSU1 acumula menos nitrito que la cepa WT. Células crecidas en 5 mM de amonio se incubaron en un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min, para luego añadirle 1 mM de nitrito. Se tomaron muestras para analizar el contenido intracelular de nitrito durante 60 min. WT (●), ScSSU1 (○).

La baja capacidad de $\Delta ssu2ScSSU1$ para crecer en nitrato puede ser consecuencia de la alta capacidad de excreción de nitrito que posee, bloqueando así la síntesis de fuentes nitrogenadas reducidas vía amonio. Se sabe además que a pH ácido concentraciones superiores a 0.5 mM resultan tóxicas para las células [129, 131]. De hecho, las cepas $\Delta ssu2ScSSU1$ son sensibles a nitrito como única fuente nitrogenada (Fig. 43).

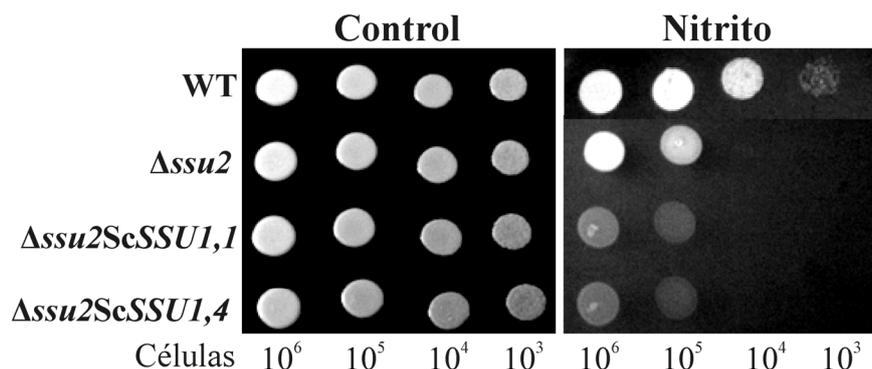


Figura 43. $\Delta ssu2ScSSU1$ presenta un crecimiento reducido en nitrito. Las células crecidas previamente en YPD, se sembraron por goteo en medios con 2 mM de nitrito. Las palcas se incubaron a 37°C durante 2 días. Se muestran dos clones, $\Delta ssu2ScSSU1,1$ y $\Delta ssu2ScSSU1,4$.

Por otro lado, hemos comprobado como en estos transformantes la cantidad de Ynt1 es mucho menor que en una cepa WT (Fig. 44), hecho que explicaría el bajo consumo de nitrato que presentan estas cepas. Es posible que el nitrito excretado al medio intracelular interfiera con la entrada de nitrato y/o tenga algún efecto negativo sobre la estabilidad de Ynt1.

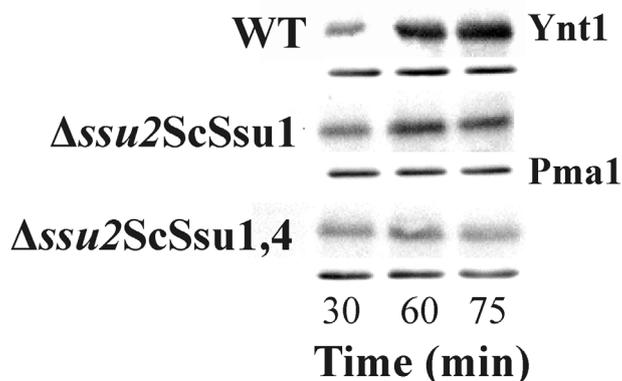


Figura 44. $\Delta ssu2ScSSU1$ presenta bajos niveles de Ynt1. Las células crecidas en amonio, se ayunaron de fuente de nitrógeno durante 90 min, antes de añadirle 1 mM de nitrato. Pma1 se usó como control de carga.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que ScSsu1 además de excretar nitrato es capaz de excretar nitrito, y parece que la afinidad por el nitrito es mucho mayor que la que tiene por el nitrato, según se desprende de los ensayos de excreción de nitrito. No obstante, se necesitan más pruebas para confirmar esta hipótesis.

1.7. La expresión de *SSU2* está disminuida en el mutante $\Delta gat1$.

Los factores transcripcionales de tipo GATA son proteínas reguladoras cuya 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 [180]. En el caso de *H. polymorpha*, de otros hongos asimiladores de nitrato y plantas, actúan como reguladores positivos que median la desrepresión causada por la presencia de fuentes de nitrógeno reducidas. En ausencia de fuentes de nitrógeno preferidas se unen a los promotores de genes del catabolismo del nitrógeno y activan su expresión [55, 56, 157]. Es por ello que nos preguntamos si estos factores transcripcionales estaban también relacionados con la excreción de sulfito, actuando sobre las permeasas Ssu1 y Ssu2. Así, decidimos analizar los fenotipos de sensibilidad a sulfito de algunos de los mutantes para los factores GATAs que disponíamos en el laboratorio. Usamos el mutante $\Delta gat1$, pues se trata de un regulador positivo de la vía de asimilación de nitrato implicado en desrepresión catabólica por nitrógeno.

La cepa $\Delta gat1$ muestra un claro fenotipo de sensibilidad a sulfito similar al que muestra el mutante $\Delta ssu1$, aunque no tan drástico como el observado en la cepa $\Delta ssu2$ (Fig. 45A). La sensibilidad a sulfito que manifiesta el mutante $\Delta gat1$ fue revertida introduciendo más copias del gen *SSU2*, como se recoge en la figura 45B. Estos resultados indican que la sensibilidad a sulfito de la cepa $\Delta gat1$ está relacionada con los niveles de *SSU2* principalmente, de hecho cuando analizamos los niveles de expresión de *SSU2* en el mutante $\Delta gat1$, usando la construcción *SSU2-lacZ* comprobamos como la expresión de *SSU2* es mucho menor en el mutante $\Delta gat1$ en relación al WT en amonio y en nitrato (Fig. 46). De hecho, la expresión en nitrato y en amonio del mutante $\Delta gat1$ es similar, no se observa inducción de *SSU2* en nitrato en esta cepa a diferencia de lo observado en el WT en presencia de nitrato, donde si existe inducción del gen *SSU2*. Si bien es cierto que en el mutante $\Delta gat1$ la vía de asimilación

de nitrato está parcialmente reprimida, la inducción por nitrato es mucho menor y más lenta, con lo cual la cantidad de nitrito producido y excretado es mucho menor, factores que podrían explicar estos bajos niveles de expresión de *SSU2* observados en $\Delta gat1$ en nitrato. Aunque con este resultado no podemos concluir que Gat1 regula la expresión de *SSU2*, si nos sirve para confirmar que la expresión de *SSU2* está regulada por el nitrito generado tras la reducción del nitrato. En el mutante $\Delta gat1$ la cantidad de nitrito producido es mucho menor que en el WT, consecuencia del reducido consumo de nitrato que presenta y por tanto, es razonable pensar que en este caso no sea necesario excretar nitrato vía *Ssu2*.

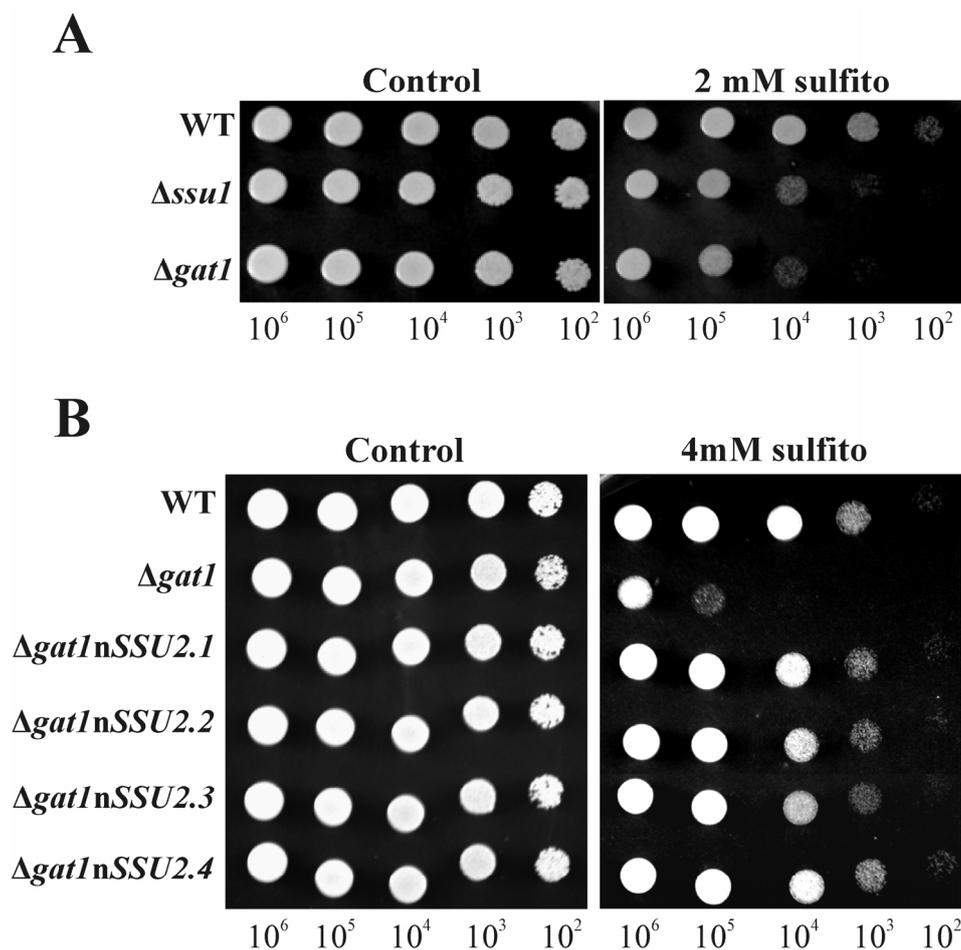


Figura 45. La sensibilidad a sulfito de la cepa $\Delta gat1$ se revierte introduciendo más copias del gen *SSU2*. Las células crecidas previamente en YPD, se sembraron por goteo en medios con 5 mM de amonio más 2 mM de sulfito (A) o con 4 mM de sulfito (B). Las placas fueron tamponadas a pH 3.5 con 75 mM de ácido tartárico-Tris. Se incubaron a 37°C durante 2 días.

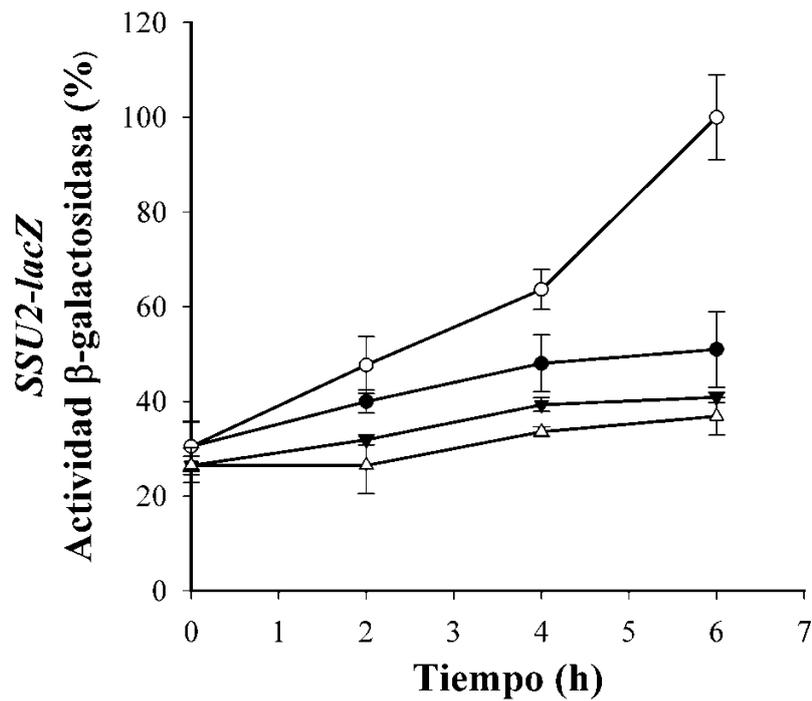


Figura 46. Niveles de expresión de $SSU2$ en el mutante $\Delta gat1$. Células crecidas hasta saturación en YPD y portadoras de la construcción $SSU2-lacZ$ fueron resuspendidas a una concentración de 3 mg/ml en 5 mM de amonio y de nitrato. A los tiempos indicados se tomaron muestras para medir la actividad β -galactosidasa en el WT en amonio (●), WT en nitrato (○), $\Delta gat1$ en amonio (Δ) y $\Delta gat1$ en nitrato (▼). El 100% de actividad se corresponde a valores de $627 \text{ nmoles } o\text{-nitrofenol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

DISCUSIÓN

La asimilación de nitrato hacía formas reducidas del mismo es un balance entre la cantidad de nitrato transportado al interior celular y la cantidad de nitrato excretado [69]. Sin embargo, muy poco se conoce sobre las entidades moleculares implicadas. En este trabajo caracterizamos la primera permeasa identificada en hongos encargada de la excreción de nitrato al medio extracelular, así como el impacto que tiene esta proteína en la vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha*.

El genoma de *H. polymorpha* posee dos genes que codifican proteínas con cierta similitud (25%) con la permeasa de sulfito (Ssu1) de *S. cerevisiae*, denominadas Ssu1 y Ssu2, respectivamente. El análisis de la secuencia de cada una y su comparación con ScSsu1 no permitió descartar a ninguna de ellas como la ortóloga en *H. polymorpha*. La interrupción de ambos genes y el estudio de los fenotipos resultantes reflejaron algunos aspectos interesantes. Por un lado, aunque ambos mutantes presentaban fenotipos de sensibilidad a sulfito, era en el mutante $\Delta ssu2$ donde se observaba una mayor sensibilidad. De esta forma, si atendemos a la sensibilidad a sulfito ambas proteínas parecían ser ortólogas a ScSsu1, siendo Ssu2 la más importante en conferir resistencia a este compuesto. Tras analizar el consumo de nitrato en los mutantes $\Delta ssu1$, $\Delta ssu2$ y $\Delta ssu1\Delta ssu2$ comprobamos como en estas cepas se incrementaba el consumo de nitrato, siendo mucho mayor en el mutante $\Delta ssu2$ que en la cepa $\Delta ssu1$. El doble mutante mostraba un comportamiento similar a la cepa $\Delta ssu2$ y la cepa portadora de varias copias de *SSU2* (*nSSU2*) presentaba un reducido consumo de nitrato. Estos resultados ya nos indicaban que Ssu2 y en menor medida Ssu1 podrían estar implicados en la excreción de nitrato. El aumento en el consumo de nitrato que presentaba $\Delta ssu2$ reflejaba que la desaparición de este compuesto del medio era mucho más rápida porque posiblemente no existía un flujo de nitrato al medio extracelular. Si nuestra hipótesis era cierta la expresión de los genes que se inducen por nitrato debería verse alterada. Efectivamente se observó como la inducción del gen *YNR1* era mayor en el mutante $\Delta ssu2$ y disminuía en la cepa *nSSU2*, lo cual iba ligado a un aumento en la excreción de nitrito en la cepa $\Delta ssu2$ y a una disminución en la cepa *nSSU2*. Este aumento en la inducción por nitrato en el mutante $\Delta ssu2$ podría explicar en parte, la sensibilidad a clorato (análogo estructural y tóxico del nitrato) [37, 295] observado en esta cepa, aunque no descartamos que este fenotipo de sensibilidad se deba a que Ssu2 sea capaz de excretar clorato además de nitrato.

Los experimentos de acumulación intracelular de nitrato y la expresión de Ssu2 en ovocitos de *Xenopus laevis* confirmaron que Ssu2 excreta fundamentalmente nitrato y no nitrito. Además la expresión de Ssu2-YFP en *Xenopus* demostró que Ssu2 al igual que ScSsu1 se localiza en la membrana plasmática [16].

Los ensayos de acumulación intracelular de nitrato se realizaron en cepas que además de carecer o sobreexpresar el gen *SSU2* tienen interrumpido el gen de la nitrato reductasa. El hecho de que fuéramos capaces de detectar consumo de nitrato en la cepa Δ ssu2 Δ ynr1 contradecía la idea propuesta por Kinghorn y colaboradores. Ellos proponen que la actividad nitrato reductasa es necesaria para el transporte neto de nitrato en hongos y no en plantas [297]. Con la caracterización de Ssu2 como permeasa de nitrato se demuestra que el bajo consumo de nitrato observado en los mutantes carentes de la nitrato reductasa de los hongos *A. nidulans* y *N. crassa* podría ser debido a un flujo de nitrato al medio extracelular, como propusieron posteriormente Wang y colaboradores [307]. De esta forma, la eliminación del sistema de excreción de nitrato (Ssu2) nos permitió detectar consumo de nitrato en cepas carentes de la nitrato reductasa. También bloqueando la salida de nitrato por Ssu2 con la adición de sulfito, fuimos capaces de cuantificar acumulación de nitrato en el mutante Δ ynr1, aunque en este caso fuese una acumulación transitoria, pues tras ser excretado el sulfito vía Ssu2, empieza a ser eliminado el nitrato. Aunque en *N. crassa* no se ha identificado el gen que codifica para Ssu1, si ha sido identificado el ortólogo en *A. nidulans*. Suponemos que estos sistemas de excreción se encuentran en los organismos asimiladores de nitrato, formando parte de los mecanismos de regulación de la vía de asimilación del mismo. De hecho, en *A. thaliana* se ha identificado la primera proteína implicada en la excreción de nitrato. NAXT1 (“Nitrate Excretion Transporter1”) se expresa en el córtex de las raíces adultas y lleva a cabo el transporte pasivo de nitrato al exterior celular cuando las células son sometidas a estrés ácido [266].

En *S. cerevisiae* la expresión de *SSU1* no solamente responde a sulfito [208] sino a óxido nítrico y a nitrito. Esto sugiere que además de excretar sulfito, Ssu1 podría excretar otros intermediarios nitrogenados reactivos [261]. En el caso de HpSSU2 es el nitrito y no el nitrato el responsable de inducir su expresión, mientras que el sulfito no parece inducir significativamente su expresión. Aunque en *H. polymorpha* no se haya demostrado la producción de óxido nítrico durante la asimilación de nitrato, suponemos que si se produciría como ocurre en otros hongos asimiladores de nitrato [266] y en

plantas [246]. Para estudiar si el NO induciría o no a *SSU2* estudiamos su expresión en el mutante de la nitrato reductasa en presencia de nitrito, pues en estas condiciones suponemos que no se generaría NO. De los resultados se desprende que es el nitrito el principal inductor de la expresión de *SSU2* y no el nitrato ni el posible NO producido. Aunque *Ssu2* excrete nitrato, es el nitrito el que induce su expresión. De esta forma, cuando se produce mucho nitrito resultado de la reducción del nitrato, se induciría la expresión de *SSU2* para excretar el exceso de nitrato y reducir así, los niveles de nitrito producido, evitando de esta forma los efectos adversos de este intermediario metabólico y la acumulación tóxica del amonio [126]. De hecho, *Ssu2* es importante para mantener la viabilidad de las células en nitrato y en nitrito, pues su mutación produce un descenso del crecimiento y viabilidad de las células en nitrato y en nitrito. El nitrito también induce los sistemas de excreción de nitrato en plantas, los cuales son relativamente estables mientras exista nitrato y nitrito [11].

El nitrito es un potente toxico para las células. Se sabe que a pH ácido tiene unos efectos drásticos sobre el contenido de ATP y el control del pH intracelular [129, 130, 131]. Esto es debido a que el nitrito, en concreto su forma protonada (ácido nitroso) a demás de producir la desaminación oxidativa de la adenina y de la citosina, actúa como agente desacoplante. Sin embargo, también resulta tóxico a pH neutro y alcalino. Uno de los posibles mecanismos de toxicidad puede que se base en su calidad de estresante oxidativo, introduciendo grupos nitro [256]. El nitrito también puede ser transformado a peroxinitrito, el cual es altamente reactivo [152]. La alta capacidad oxidante del peroxinitrito hace que produzca mutaciones en al ADN, oxidación de proteínas y peroxidación lipídica entre otros efectos [168].

S. cerevisiae muestra una sensibilidad moderada al nitrito (0.5-1 mM) [129, 130]. En *H. polymorpha* esta sensibilidad se manifiesta en concentraciones más altas, en torno a 3-5 mM, lo cual la hace más resistente a este anión que *S. cerevisiae*. Sin embargo, los mutantes $\Delta ssu1$ y $\Delta ssu2$ son sensibles a nitrito. Esta sensibilidad puede deberse al aumento del consumo de nitrito que muestran estas cepas, sobre todo $\Delta ssu2$. La excreción de nitrato por parte de *Ssu2* supone, aunque de manera indirecta, una forma de eliminar el exceso de nitrito consumido, y podría explicar la baja viabilidad celular que presenta la cepa $\Delta ssu2$ en nitrito. Si consideramos la posibilidad de que *H. polymorpha* tenga el gen que codifica la flavohemoglobina, es posible que en presencia de nitrito se produzca óxido nítrico tras ser reducido por la nitrato reductasa. Este NO

sería transformado a nitrato por acción de la flavohemoglobina. La delección de *SSU2* impediría la excreción de este nitrato, el cual actuaría induciendo los genes de la vía, produciendo más nitrito y amonio. Por otro lado, *H. polymorpha* y otros hongos asimiladores de nitrato [33, 66, 214] excretan nitrito hasta concentraciones milimolares cuando crecen en nitrato como única fuente de nitrógeno. Esta aparente falta de rendimiento en la reducción del nitrato y la excreción de un producto altamente tóxico, puede permitirles competir con otros organismos más sensibles al nitrito que *H. polymorpha*. Además de reducir las concentraciones intracelulares de nitrito y la acumulación de amonio.

Aunque en *H. polymorpha* no se haya identificado el gen de la flavohemoglobina, presuponemos su existencia. En plantas [217] y en algunos hongos asimiladores de nitrato como *A. nidulans* [266], la flavohemoglobina protege de la toxicidad generada por el NO e impide la inactivación que produce sobre la NR y NiR.

La expresión de ScSSUI en el mutante $\Delta ssu2$ de *H. polymorpha* fue capaz de restablecer la tolerancia a sulfito. Las cepas $\Delta ssu2$ ScSSUI mostraban además un crecimiento reducido tanto en nitrato como en nitrito, debido posiblemente a la baja tasa de consumo de nitrato y nitrito que presentan. El análisis de la acumulación intracelular de nitrato reveló que ScSsu1 es capaz de excretar nitrato, pues la cepa $\Delta ssu2$ ScSSUI $\Delta ynr1$ a diferencia de $\Delta ynr1$ $\Delta ssu2$, no acumulaba nitrato. No obstante a diferencia de Ssu2, ScSsu1 además de excretar nitrato, excreta nitrito. Estructuralmente el sulfito se asemeja más al nitrito. Sin embargo, desconocemos porque la afinidad de HpSsu2 por el nitrato y no por el nitrito. Puede que originariamente tuviera afinidad por nitrato y nitrito pero perdió la capacidad de excreción de nitrito, especializándose en excretar más eficientemente nitrato. De hecho, tenemos evidencias que muestran la existencia de otros mecanismos implicados en la excreción de nitrito en *H. polymorpha* (Rafaela González, GMN. Tesis Doctoral). Asimismo, ScSsu1 además de ser responsable de la tolerancia a sulfito en esta levadura, puede que también lo sea de la tolerancia a nitrito. Estos datos sugieren que la función de esta permeasa de sulfito como sistema de excreción de nitrato se mantiene aún cuando el organismo no es capaz de asimilar nitrato, como es el caso de *S. cerevisiae*. No es un hecho aislado y exclusivo de nuestra levadura modelo. Es posible que Ssu1 de *A. nidulans* y de *C. albicans* también sean capaces de excretar nitrato y /o nitrito.

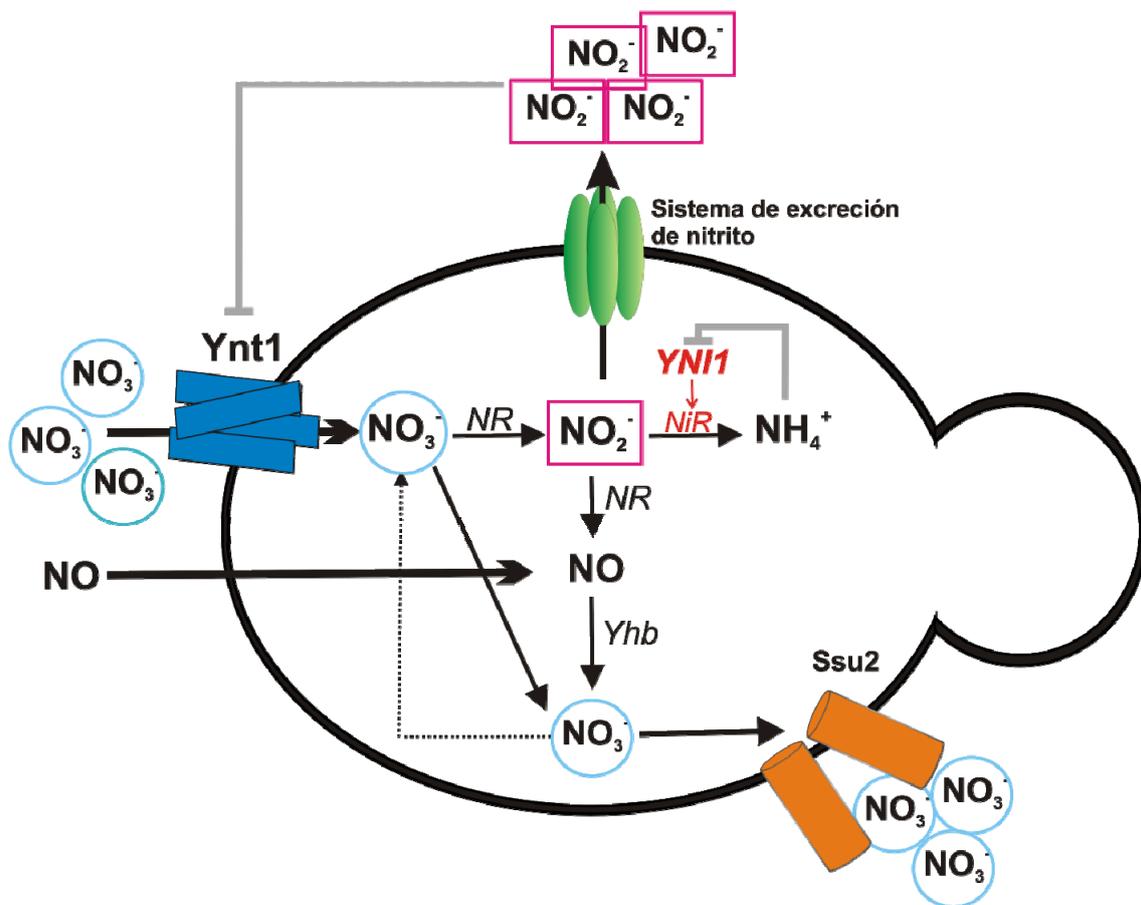


Figura 47. Participación de Ssu2 en la excreción de nitrato en *H. polymorpha*. El nitrato entra en la célula a través de Ynt1, éste es transformado a nitrito, y el nitrito es reducido hasta amonio. La acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas regula negativamente el gen que codifica para la nitrato reductasa (*YNI1*) lo que provoca una disminución de la nitrato reductasa (*NiR*) y en consecuencia, un aumento en la excreción de nitrito a través de los sistemas de excreción de nitrito. La nitrato reductasa (*NR*) es capaz de transformar el nitrito producido a óxido nítrico (*NO*), un producto altamente tóxico, que rápidamente es transformado a nitrato por acción de la flavohemoglobina (*Yhb*). El *NO* también puede provenir del exterior celular y atravesar la membrana por libre difusión. Pensamos que es probable que estos mecanismos de producción de *NO* y detoxificación del mismo, también se hayan desarrollado en nuestra levadura. En base a nuestros resultados proponemos que parte del nitrato que entra a través de Ynt1 como el que se produciría por medio de la actividad óxido nítrico dioxigenasa de la flavohemoglobina sería eliminado al exterior celular a través de Ssu2. Es posible que parte del nitrato producido por la flavohemoglobina pueda incorporarse a la vía de asimilación del mismo.

En definitiva, estos resultados evidencian la importancia de la existencia de un sistema de excreción de nitrato en organismos asimiladores del mismo, aunque la existencia de una proteína que participa en la extrusión de nitrato en un organismo que es capaz de asimilarlo parece un poco contradictorio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la levadura transporta más nitrato del que es capaz de asimilar y mucho de este nitrato es eliminado en forma de nitrito y otra parte en forma de nitrato. Es una

manera de mantener los niveles intracelulares de nitrito y de amonio en equilibrio. Todos estos resultados se recogen a modo de esquema en la figura 47.

2. El Transporte de potasio en *H. polymorpha*. Mecanismos implicados en la regulación transcripcional y postraducciona del transportador de K^+ de alta afinidad Hak1.

*En este capítulo identificamos los dos tipos de proteínas implicadas en el transporte de K^+ en *H. polymorpha*, Trk1 y Hak1. La coexistencia de ambos tipos de transportadores es típica de organismos que viven en hábitats donde las concentraciones de K^+ son muy limitantes. Mientras Hak1 es un transportador de K^+ de alta afinidad, la actividad transportadora de Trk1 parece ser más importante en el control del potencial de membrana. Mostramos además, los mecanismos de regulación transcripcional y postraducciona que afectan a Hak1. Los niveles de HAK1 responden a bajas concentraciones de K^+ de manera dependiente de la calcineurina y Gat1. En lo referente a la regulación postraducciona, Hak1 es endocitado y degradado en la vacuola en presencia de altas concentraciones de K^+ . Npr1 también parece participar en la regulación postraducciona de Hak1.*

2.1. El genoma de *H. polymorpha* presenta dos pautas abiertas de lectura similares a SoTrk1 y a SoHak1.

El potasio es un elemento esencial para la vida, pues los niveles intracelulares de este catión regulan diversos parámetros fisiológicos tales como: turgor, potencial de membrana, fuerza iónica o pH intracelular. Es por ello, que el transporte de potasio en las células debe ser regulado de manera muy precisa.

En *S. cerevisiae*, las quinasas de proteínas Hal4 y Hal5 participan en la regulación del transportador de potasio Trk1, más concretamente participan en la estabilización de este transportador en la superficie celular [228]. Así mismo, estas quinasas también regulan la estabilidad celular de otras proteínas de membrana, como es el caso de Can1, Fur4 y Hxt1 en condiciones limitantes de potasio [228]. Las proteínas Hal4 y Hal5 pertenecen a una familia de quinasas de proteínas donde también se incluye la quinasa Npr1. En *H. polymorpha*, Npr1 participa en la regulación del transportador de nitrato, Ynt1, controlando su distribución celular en función de las fuentes nitrogenadas [187, 213]. El hecho que Npr1 perteneciera a la misma familia de quinasas que Hal4/5 nos llevó a preguntarnos si Npr1 estaba implicado en la regulación del transporte de potasio y la homeostasis catiónica en *H. polymorpha*. Resultados obtenidos en nuestro grupo por Yusé Martín [185] ponían de manifiesto que Npr1 podría participar en la regulación del transporte de potasio en *H. polymorpha*.

Con el objetivo de estudiar en profundidad el papel de Npr1 sobre el transporte de K^+ y la influencia de los transportadores de K^+ sobre el transporte de nitrato vía

Ynt1, se inició la caracterización de los posibles sistemas de transporte de este catión en *H. polymorpha*.

Para la caracterización de los transportadores de potasio en *H. polymorpha* se realizó una búsqueda en el genoma de esta levadura de putativas proteínas similares a los dos tipos de transportadores de K^+ presentes en *S. occidentalis* [19, 20] y en *N. crassa* [121, 249]. En estos organismos se han identificado dos sistemas de transporte de potasio. Junto con Trk1, poseen otro transportador de alta afinidad denominado Hak1 [19, 20, 121, 249] que se caracteriza por su mayor capacidad para transportar potasio cuando éste se encuentra en muy bajas concentraciones. La presencia de este transportador se asocia evolutivamente al hábitat común de estos organismos, el suelo, donde las variaciones de las concentraciones de K^+ son muy drásticas. El hecho de que *H. polymorpha* sea una levadura no convencional, aislada del suelo, al igual que *S. occidentalis*, nos llevó a considerar la posibilidad de que en el transporte de potasio estuvieran implicados estos dos sistemas.

Esto se confirmó al identificar dos pautas abiertas de lectura que codificaban proteínas con una alta similitud a Trk1 y Hak1 de *S. occidentalis*, que denominamos HpTRK1 y HpHAK1, respectivamente. Las características de estas hipotéticas proteínas se muestran en las tablas 3 y 4. El análisis bioinformático reveló una alta similitud tanto a nivel de secuencia como en sus propiedades biofísicas con sus respectivas proteínas ortólogas de *S. occidentalis*.

Tabla 3. principales características de HpTrk1 y SoTrk1.

	HpTrk1	SoTrk1
Masa molecular (Da)	125468.78	116641.51
pI	8.93	7.69
Número de residuos	1102	1018
Dominio TRK	204-955	530-930
Similitud	45%	-

Según se desprende de los análisis bioinformáticos, HpTrk1 al igual que otros transportadores de este tipo, está formada por 8 dominios transmembranales que se organizan en 4 MPM, es decir, fragmento transmembrana-lazo hidrofóbico-fragmento transmembrana que terminan en un extremo carboxilo citoplasmático. HpTrk1 también presenta un residuo de glicina en todos los fragmentos P (lazos hidrofóbicos que

conectan los fragmentos transmembrana) y justo después de finalizar el fragmento Pd. Estos residuos de glicina son fundamentales para la selectividad por K⁺ de los canales y transportadores de K⁺ en general [80] Además posee unas secuencias conservadas en todos los transportadores de TRK-HKT de eucariotas en la región M2b (GNTGFP) y en Pd (ITSAYG) [247] (Fig. 48). Entre los segmentos hidrofóbicos 3 y 4 se encuentra una región citoplasmática de unos 470 residuos.

	M1	P	M2	
a	51 PNFVLAHYTYIVFWCIIGSILYPPKKNIK	YIDALFFAAGASTQA GLN TVDTN	YQQIVTYCVTMLTTPIFIHSAIVFLR	126
b	601 LLSTILVSYIYIGFHLVGIICFVPEITKR	APAWWGFWYYP QTCFNDL GIT LTPDSMIS	FTLLGGFLIVAGNTGFPFIFLR FIIW	700
c	533 GPTWLLFVFLVVLNCDWLLFIILDFNK	YRVLDGLFQAISTRTA GLSVVDLSR	PAVQVSYLVMYISVMPLAISIRR	819
d	865 THLRKQLSFDLWFLFLGLFIICISEGGRLN	IFSCLFEITSAYGTVG LSLGYP NTT	TLSKVVLIIIMMVRGRH RGLPYAID	956

Figura 48. Alineamiento de los 4 fragmentos M1PM2 de HpTrk1. Trk1 contiene 12 fragmentos hidrofóbicos (de color gris) de los cuales, 8 (M1 y M2) son regiones transmembranales. Los residuos de glicina conservados en todos los transportadores TRK-HKT se muestran de color blanco [82, 83]. En negrita se señalan las regiones conservadas en M2b y en Pd [248].

El análisis comparativo de la secuencia reveló que HpTrk1 presenta una similitud moderada, aproximadamente del 55%, con otros Trk1 de diferentes levaduras y hongos. Así por ejemplo, presenta un 60% de similitud con DhTrk1, un 55 % con ScTrk1, 46% con SpTrk1 y SoTrk1 y un 51% con NcTrk1 (Fig. 49).

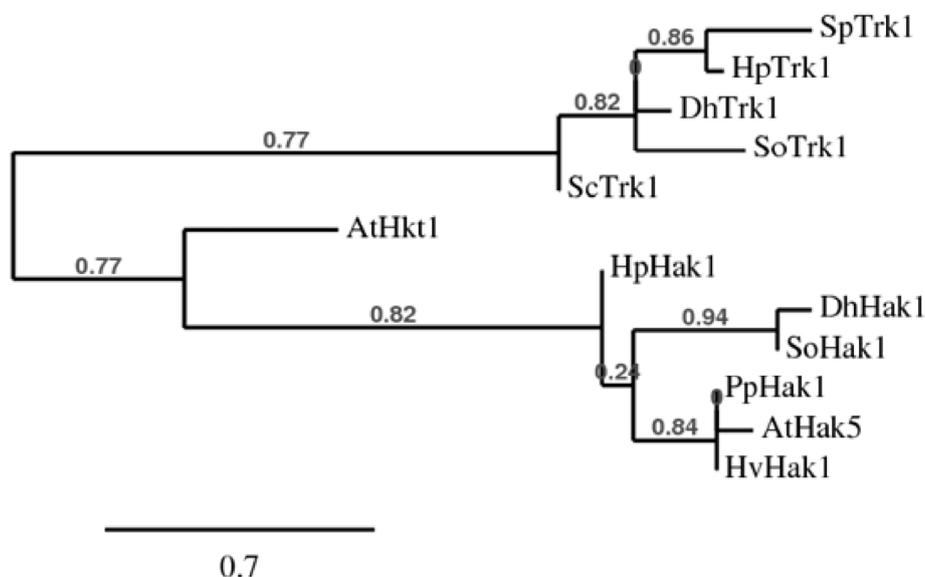


Figura 49. Árbol filogenético de transportadores TRK y HAK construido por el método de “neighbor-joining” (NJ). Las secuencias fueron alineadas usando la aplicación ClustalW. El árbol fue construido empleando la aplicación informática “phylogeny.fr” [77]. La escala equivale a 0.7 cambios por sitio. Hp, *H. polymorpha*; Sc, *S. cerevisiae*; Sp, *S. pombe*; Nc, *N. crassa*; So, *S. occidentalis*, Dh, *D. hansenii*; Pp, *Physcomitrella patens*; At, *A. thaliana*; Hv, *H. vulgare*.

HpHak1 está formada por 11-12 dominios transmembranales, según las predicciones informáticas. En este caso, al igual que otros transportadores de este tipo, presentan un largo extremo carboxilo terminal y citosólico de aproximadamente 290 residuos, muy rico en aminoácidos con carga como: lisina, serina y treonina (Fig. 50). Además posee en el primer dominio transmembrana la siguiente secuencia consenso **GAIYGDLGTSPLY** (en negrita se resaltan los residuos conservados) compartida por otros transportadores de este tipo en plantas (HvHak1 y AtHak1) [247] y en hongos (SoHak1 y NcHak1) [20, 121]. Presenta en torno a un 45% de similitud con DhHak1 y SoHak1.

Tabla 4. principales características de HpHak1 y SoHak1.

	HpHak1	SoHak1
Masa molecular (Da)	85900.25	91935.37
pI	6.5	8.8
Número de residuos	769	821
Dominio HAK	1-716	80-820
Similitud	47%	-

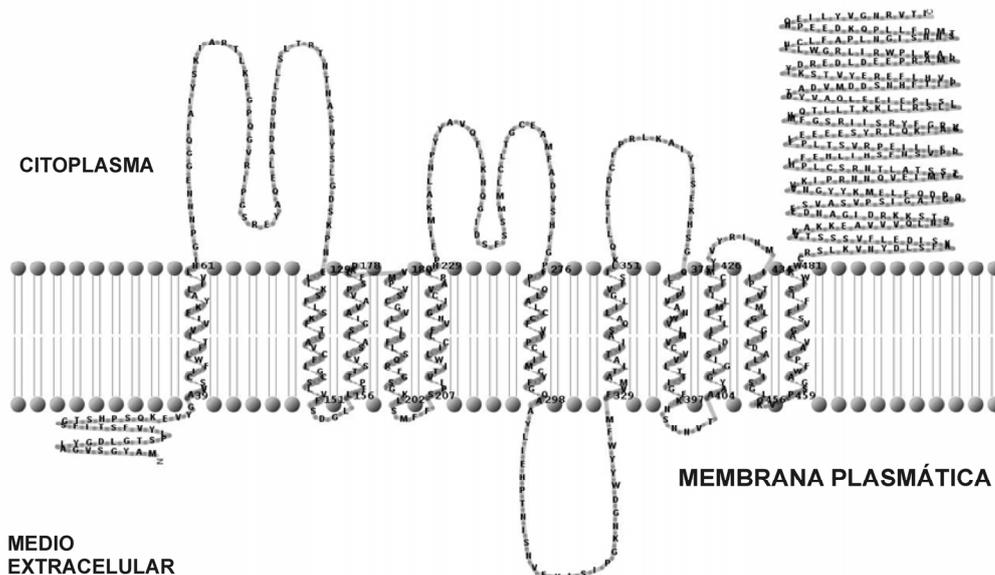


Figura 50. Representación topológica de HAK1. Los dominios transmembranales fueron predichos usando los programas SOSUI y PREDICT PROTEIN PHDhtm. La representación se hizo mediante el programa tmrpres2d.

2.2. La interrupción de *TRK1* y *HAK1* afecta negativamente al crecimiento en medios con bajo K^+ .

Para estudiar el papel de Trk1 y Hak1 en el transporte de potasio se construyeron las cepas mutantes $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$ y se estudió su

comportamiento al alterar las concentraciones de potasio. En medios con baja concentración de K^+ ambos mutantes presentan una drástica reducción del crecimiento (Fig. 51), siendo ligeramente superior en el mutante $\Delta hak1$ que en $\Delta trk1$. En el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ el crecimiento es todavía menor. Este fenotipo se revierte completamente en medios suplementados con 50 mM de KCl. La diferencia de crecimiento entre los distintos mutantes se ve más clara en medio líquido suplementado con 0.5 mM de KCl (Fig. 52).

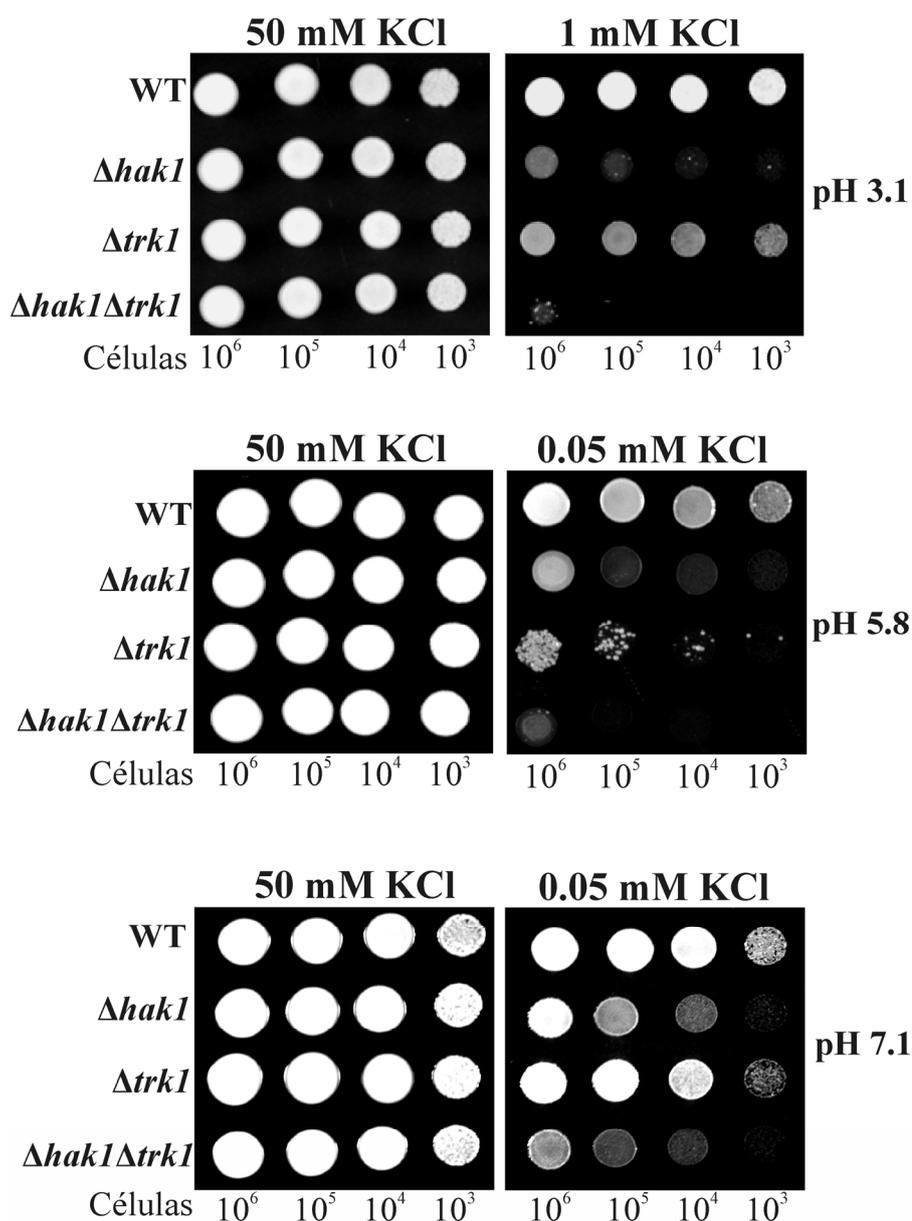


Figura 51. Los mutantes $\Delta hak1$ y $\Delta trk1$ presentan deficiencias de crecimiento en medios con bajas concentraciones de K^+ . Diluciones seriadas de las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios con KCl a las concentraciones indicadas. Las placas fueron tamponadas a pH 3.1 con 75 mM de ácido tartárico-Tris, a pH 5.8 con 50 mM MES-Tris y a pH 7.1 con 25 mM Tris-HCl. Las placas fueron incubadas durante 2 días a 37°C.

Determinamos también si el déficit de crecimiento a bajas concentraciones de K^+ estaba influenciado por el pH. En *S. occidentalis* Hak1 opera en condiciones de bajo pH y bajo K^+ , mientras que SoTrk1 lo hace a pH alto [20]. La figura 51 recoge el test de crecimiento en condiciones limitantes de K^+ a distintos pH. Aunque a pH ácido los requerimientos de potasio se hacen mayores, el mutante $\Delta hak1$ sigue siendo mucho más sensible que la cepa $\Delta trk1$ y el doble mutante es aún más sensible que los anteriores. Estos resultados son similares a los que se han descrito en *S. occidentalis* para pH ácidos. Sin embargo, a pH altos, Hp $\Delta trk1$ no tiene el mismo comportamiento que So $\Delta trk1$, ya que el crecimiento del mutante $\Delta trk1$ a pH 7.1 no es menor que $\Delta hak1$. Estos resultados indican que Trk1 y Hak1 están implicados en el transporte de potasio en *H. polymorpha*, aunque Hak1 parece ser más importante que Trk1 para el crecimiento en condiciones limitantes de K^+ independientemente del pH. Dado que el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ es capaz de crecer en medios con bajo potasio, no descartamos la existencia de otro sistema de transporte de K^+ .

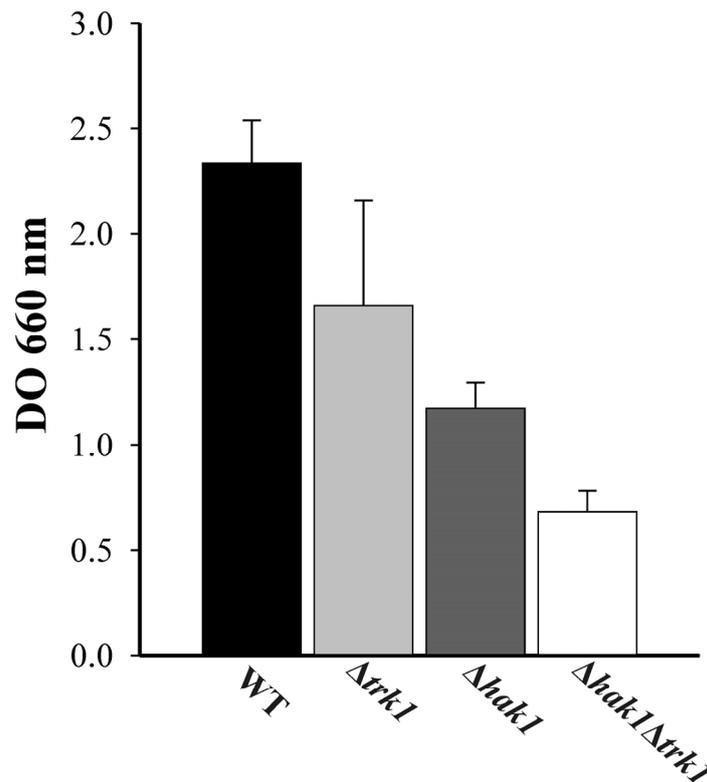


Figura 52. La interrupción de *TRK1* y *HAK1* afecta al crecimiento a bajas concentraciones de K^+ . Crecimiento de las cepas indicadas en medio líquido con 0.5 mM de KCl. Células crecidas previamente en YPD, se lavaron antes de ser resuspendidas a una $DO_{660\text{ nm}}$ inicial de 0.2 en un medio con 0.5 mM de KCl. Se representan los resultados tras 14 h de crecimiento a 37°C.

2.3. La interrupción de *TRK1* aumenta la sensibilidad de *H. polymorpha* a cationes tóxicos.

El transporte de potasio regula numerosos procesos fisiológicos, entre los que se encuentra el potencial de membrana. En *S. cerevisiae* los principales determinantes del potencial de membrana son la H⁺-ATPasa Pma1, como generador electroquímico, y el sistema de transporte de potasio de alta afinidad Trk1,2 como principal consumidor [95, 113] Por consiguiente, Pma1 y Trk1,2 regulan importantes parámetros biofísicos como son el pH interno y externo, el turgor de las células, las concentraciones de potasio intracelulares o la entrada de cationes. El modelo de acción propuesto para estos sistemas establece que modificaciones en la actividad de uno u otro afectan drásticamente a los valores del potencial de membrana. Así, una disminución de la actividad de Pma1 se traduce en un medio intracelular más positivo con la consiguiente disminución de la entrada de cationes como Li⁺, Na⁺ e higromicina B [113]. Por tanto, en estas condiciones la célula aumenta su tolerancia a estos compuestos. En el caso de los sistemas de transporte de alta afinidad de potasio Trk1/2, un descenso de su actividad acarrea una disminución de los niveles intracelulares de potasio. Esto supone un aumento del potencial de membrana, más negativo en el interior, por lo que se incrementa la entrada y la sensibilidad a cationes tóxicos [205].

Con el fin de analizar si alguno de estos transportadores participaba en la regulación del potencial de membrana, estudiamos el efecto de la interrupción de *HAK1* y *TRK1* sobre los fenotipos de sensibilidad a diferentes cationes tóxicos. El mutante $\Delta trk1$ presenta un menor crecimiento en presencia de Na⁺, Li⁺ e higromicina B, siendo mucho más significativo en presencia de este último compuesto (Fig. 53). La sensibilidad a estos cationes de la cepa $\Delta hak1$ es mucho menos acusada. Este hecho sugiere una menor tasa de entrada de estos cationes en la célula. Estos resultados indican que en las condiciones ensayadas, Trk1 participa en el control del potencial de membrana y no Hak1.

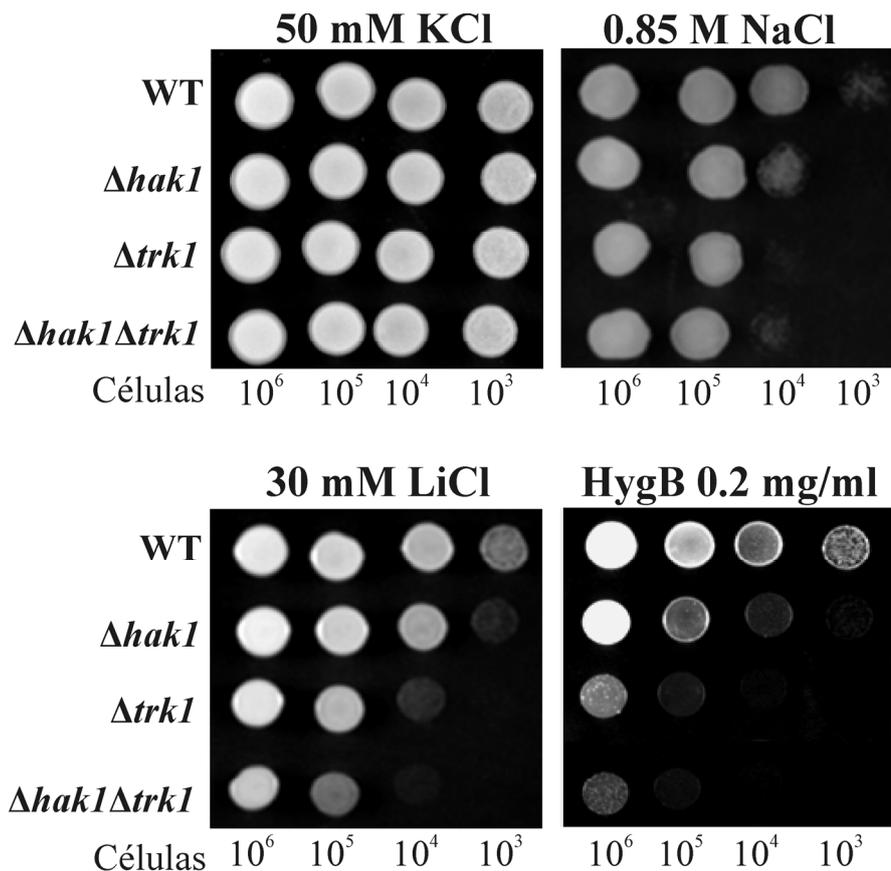


Figura 53. El mutante $\Delta trk1$ presenta déficit de crecimiento en presencia de cationes tóxicos. Diluciones seriadas de las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios suplementados con 50 mM de KCl y las concentraciones indicadas de NaCl, LiCl e higromicina B, tamponados a pH 5.8 con 50 mM MES-Tris. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días.

Por otro lado, nos preguntamos qué ocurriría con la sensibilidad a higromicina B de estos mutantes en condiciones limitantes de K⁺. Los resultados de los test de crecimiento donde se combinan medios con bajas concentraciones de K⁺ e higromicina B (Fig. 54), ponen de manifiesto que el mutante $\Delta hak1$ presenta una alta sensibilidad a higromicina B a concentraciones limitantes de K⁺, mayor incluso que la mostrada por la cepa $\Delta trk1$. En estas condiciones de bajo K⁺ el transportador que opera es Hak1 y al no estar presente, la entrada de K⁺ disminuye, con lo cual el potencial de membrana aumenta (se vuelve más negativo) produciendo una mayor entrada de higromicina B y como consecuencia, un aumento en la sensibilidad a este catión tóxico.

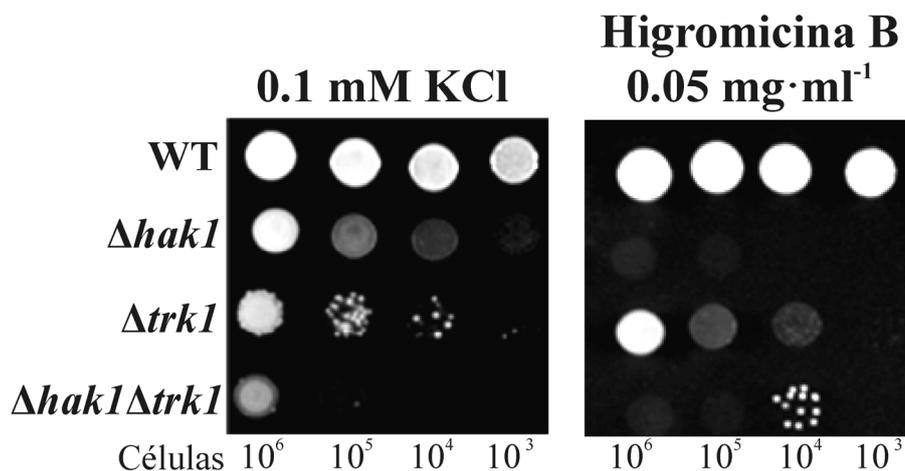


Figura 54. Efecto de la presencia de higromicina B en condiciones limitantes de K^+ . Las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios suplementados con 0.1 mM de KCl y la concentración indicada de higromicina B. Las placas se tamponaron a pH 5.8 con 50 mM MES-Tris y se incubaron a 37°C durante 2 días.

2.4. Caracterización cinética del transporte de potasio. HpHak1 es un transportador de potasio de alta afinidad.

Para confirmar la alteración del transporte de potasio en el mutante $\Delta hak1$ y caracterizar a Hak1 como un transportador de potasio de alta afinidad determinamos los niveles intracelulares y extracelulares de potasio en distintas condiciones, así como sus parámetros cinéticos. Utilizamos rubidio como indicador del transporte de potasio¹. En un primer ensayo se estimó la acumulación intracelular de rubidio de células crecidas en medio mínimo e incubadas con 10 mM de RbCl. Se puede observar como la entrada de Rb^+ disminuye en el mutante $\Delta hak1$ con respecto a la cepa WT (Fig. 55A). Esta diferencia se hace más acusada al ayunar las células de potasio y cuantificar la entrada de Rb^+ a partir de 0.01 mM de RbCl, pues con el ayuno estamos favoreciendo la expresión de *HAK1* en el WT. En este caso, los niveles intracelulares de Rb^+ son prácticamente indetectables en la cepa $\Delta hak1$ (Fig. 55B), mientras que en el WT la entrada de Rb^+ es mucho más rápida. Estos resultados ponen también en evidencia que en condiciones limitantes de Rb^+ la importancia de Trk1 en el transporte de este catión es escasa, casi la totalidad del transporte ocurre vía Hak1.

¹ Todos estos ensayos fueron realizados por el grupo del Dr. José Ramos. Universidad de Córdoba.

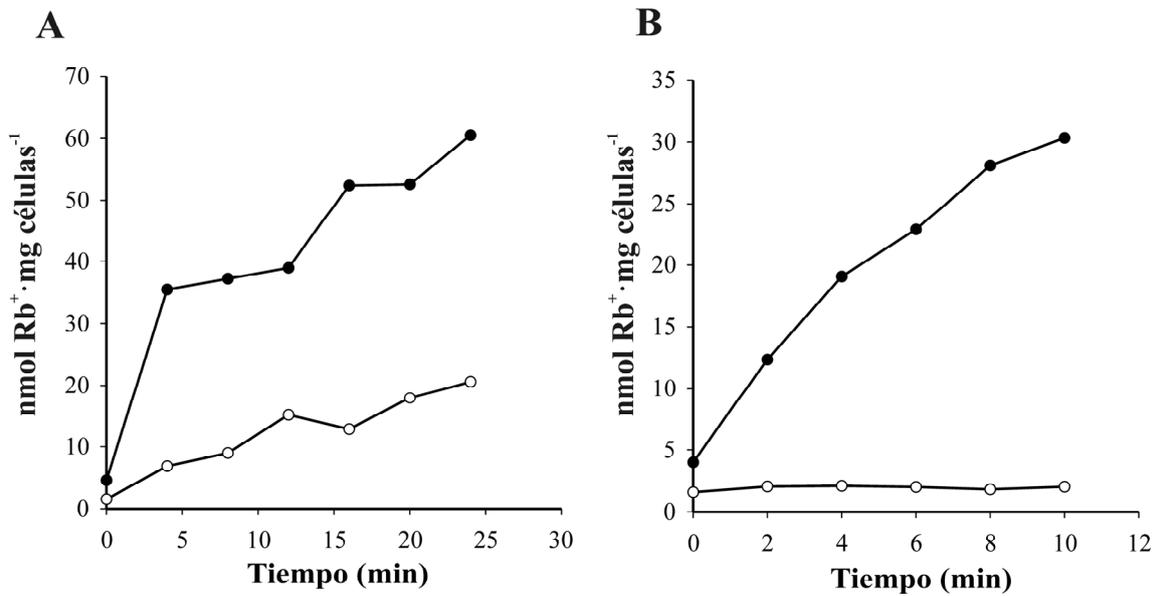


Figura 55. El mutante $\Delta hak1$ presenta un reducido transporte de Rb^+ . **A.** Células crecidas en medio mínimo suplementado con 0.5 mM de KCl hasta una DO_{600} de 0.3. A continuación se le añadió 10 mM de RbCl y se determinó la acumulación intracelular del mismo. **B.** Las células se crecieron igual que en el caso anterior, pero esta vez se ayunaron de K^+ durante 5 horas. Después de este tiempo, las células se recogieron, se resuspendieron en tampón MES-Tris pH 5.8 con glucosa, se añadió RbCl (0.01 mM) y se siguió la acumulación del Rb^+ . Los experimentos se repitieron tres veces sin variaciones significativas. WT (●) y $\Delta hak1$ (○).

Se obtuvieron los mismos resultados cuando se determinó la depleción del K^+ en el medio. Para ello se procede igual que para el caso anterior, se crecen las células en medio mínimo con 50 mM de KCl, se ayunan de potasio durante 4 horas y se dispara el ensayo con 0.08 mM de KCl. Como se representa en la figura 56, tanto la cepa WT como el mutante $\Delta trk1$ consumen la mitad del K^+ añadido al medio tras 10 min de incubación, llegando a consumir casi la totalidad del K^+ añadido después de 1 hora. Sin embargo, en la cepa $\Delta hak1$ y en el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$, el consumo de K^+ es nulo, llegando a perder K^+ durante el tiempo que dura el experimento. Todos estos ensayos indican que Hak1 pertenece al grupo de transportadores de potasio de alta afinidad. Es por ello, que decidimos analizar las constantes cinéticas que caracterizaban a Hak1.

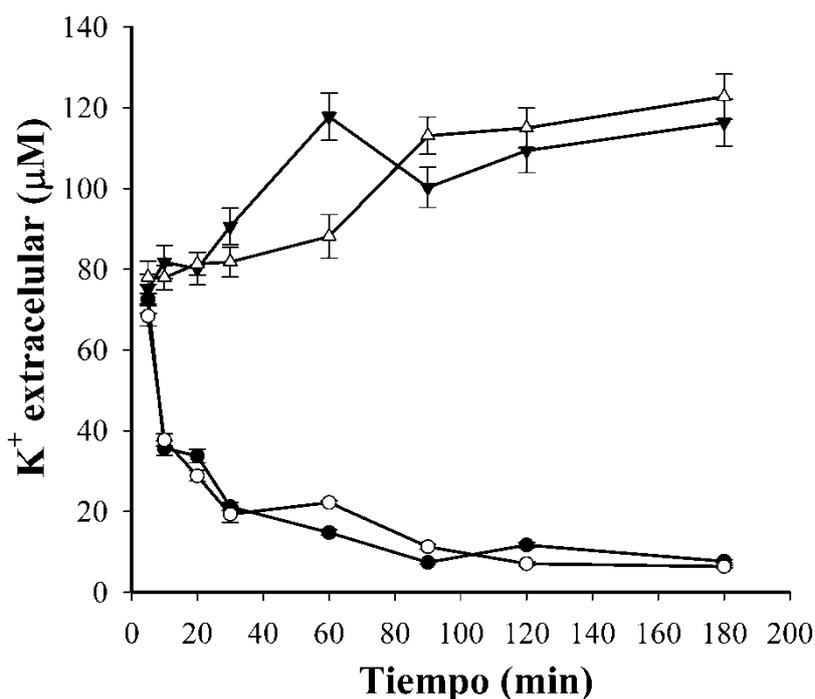


Figura 56. Variación del K⁺ extracelular. Las células se crecieron en medio mínimo suplementado con 50 mM de KCl para luego ser ayunadas de K⁺ durante 4 horas. Posteriormente fueron resuspendidas en tampón MES-Tris pH 5.8 con glucosa a una DO₆₀₀ de 0.65, se les añadió 80 µM de KCl y se determinó el K⁺ en el medio extracelular a los tiempos que se indican. Se representan WT (●), Δtrk1 (○), Δhak1 (▼) y Δhak1Δtrk1 (Δ).

De forma general, el carácter de alta afinidad se le puede atribuir a un transportador de potasio cuando los valores de K_m para el sustrato son inferiores a 0.05 mM, con pequeñas variaciones entre los distintos transportadores descritos [20, 114, 121, 237, 260]. La tabla 5 recoge los valores de K_m y V_{max} medidos en una cepa silvestre y en el mutante $\Delta hak1$ en dos condiciones diferentes. En la primera de las condiciones ensayadas las células fueron crecidas en 0.5 mM de KCl, mientras que en la segunda, se crecieron en 50 mM de KCl y se ayunaron de K⁺ durante 4 horas antes de añadirle diferentes concentraciones de RbCl. Cuando las células no se someten a ayuno previo, los valores de K_m en el WT son del orden de 0.6 mM, en cambio cuando las células se ayunan los valores de la K_m disminuyen considerablemente llegando a alcanzar valores de 0.01 mM. Los valores de V_{max} (medidos en el WT) expresados en nmol de Rb·min⁻¹·mg de células⁻¹ si permanecen relativamente constantes, en torno a 10-12.5. Los datos de K_m y V_{max} para el mutante $\Delta hak1$ son diferentes a los obtenidos en el WT. En el mutante $\Delta hak1$ los valores de K_m medidos en condiciones de ayuno son 2 órdenes de magnitud mayor y la V_{max} se reduce en torno a un 75% si la comparamos

con el WT. De estos resultados se deduce que la participación de Trk1 en el transporte de K^+ / Rb^+ es muy escasa en condiciones limitantes de Rb^+ , su afinidad por el K^+ / Rb^+ es muy baja y su capacidad de transporte de K^+ también es menor que la de Hak1. Estos resultados confirman que Hak1 es un transportador de K^+ de alta afinidad al igual que SoHak1, NcHak1 y HvHak1 entre otros, típico de organismos que viven en ambientes donde las concentraciones de K^+ son muy variables.

Medios	Células crecidas en 0.5 mM KCl		Células ayunadas de K^+	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
	(mM)	($nmol^{-1} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	(mM)	($nmol^{-1} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)
WT	0.6±0.02	10±1	0.01±0.001	12.5±1
$\Delta hak1$	10±0.5	5±0.5	1.7±0.05	3.5±0.5

Tabla 5. Parámetros cinéticos para el transporte de Rb^+ en el WT y en el mutante $\Delta hak1$ bajo dos condiciones diferentes. Las células crecidas en 0.5 mM KCl se resuspendieron en un medio libre de K^+ en un caso. Para la otra condición, las células se ayunaron de K^+ durante 4 h antes de ser resuspendidas en tampón MES-Tris pH 5.8 con glucosa. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante la representación gráfica de Lineweaver-Burk (doble recíproca). Se representan los datos de 3 experimentos independientes \pm DE.

2.5. La expresión de *HAK1* y no la de *TRK1* es regulada positivamente por ausencia de K^+ .

Utilizando la construcción que porta el promotor de *HAK1* fusionado al gen reportero *lacZ* estudiamos que factores inducían la expresión de este gen. Comprobamos que en ausencia de K^+ se inducía la expresión de *HAK1*, mientras que no se detectaba expresión cuando en el medio había altas concentraciones de K^+ (Fig. 57A). Estos resultados fueron confirmados por qRT-PCR (Fig. 57B).

Estas variaciones en la expresión de *HAK1* no fueron observadas en *TRK1*. Empleamos la misma estrategia para analizar la expresión de *TRK1*, fusión de la región promotora de *TRK1* al gen *lacZ* y qRT-PCR. Por ambos métodos observamos como la expresión de *TRK1* no sufría variaciones considerables en función de las concentraciones de K^+ (Fig. 57B) y de NaCl, y del pH. Puede que la posible implicación de Trk1 en el control del potencial de membrana, explique su expresión constitutiva, al igual que le ocurre a SoTrk1 [20].

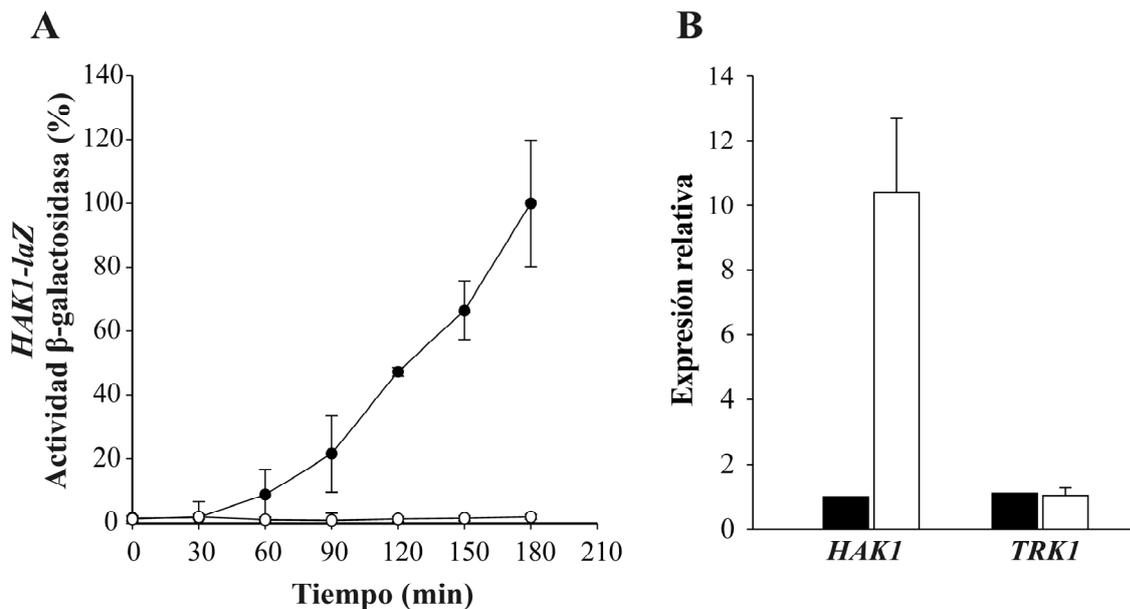


Figura 57. La expresión de *HAK1* incrementa en condiciones limitantes de K⁺ a diferencia de *TRK1*, que no sufre variaciones en las condiciones testadas. **A.** A los tiempos indicados se tomaron muestras para determinar la actividad β-galactosidasa en la cepa WT_{PHAK1}-lacZ en un medio sin K⁺ (●) y en otro suplementado con 20 mM de KCl (○). El 100% de actividad corresponde a valores de 472 ± 3.7 nmoles o-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹. **B.** Expresión relativa de *HAK1* y *TRK1* en un medio sin K⁺ (barra blanca) respecto al medio con 20 mM de KCl (barra negra). La expresión de *HAK1* y *TRK1* se determinó mediante qRT-PCR tras 2 h de incubación en los tiempos indicados. Se usó el gen *ACT1* (actina) como control interno. Se representan los valores medios ± D.E. de tres experimentos independientes.

2.6. La calcineurina participa en la regulación de *HAK1* vía *Crz1* y *Gat1*.

Como se comentó en la introducción, entre los reguladores positivos de ScTrk1 se encuentra la calcineurina. Se ha demostrado que la interrupción de la calcineurina afecta al consumo de K⁺, ya que regula la expresión de *HAL5* y por consiguiente, la estabilidad de Trk1 [50]. En *S. cerevisiae*, la calcineurina juega un importante papel en respuesta a diferentes formas de estrés, como por ejemplo, el estrés salino provocado por la presencia de cationes (Na⁺, Li⁺, etc.). Esta enzima es un heterodímero compuesta por una subunidad catalítica (codificada por *CNA1* o *CNA2*) y por una subunidad reguladora (codificada por *CNBI*). La activación de la calcineurina mediada por algún tipo de estrés se produce por un aumento transitorio de Ca²⁺ intracelular que causa cambios en la expresión de ciertos genes, llevada a cabo por el factor transcripcional Crz1. La calcineurina produce la defosforilación y entrada en el núcleo de Crz1, el cual se une a las secuencias CDRE (“Calcineurin Dependent Response Elements”) presentes en las regiones promotoras de los genes diana [50].

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha establecido que mientras los niveles de Gat1 son regulados por la calcineurina, la mutación de *GAT2* (otro factor transcripcional de tipo GATA) produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares, ya que tiene una expresión reducida de Pmr1 (transportador de Ca^{2+} del golgi, cuya función es transportar Ca^{2+} al interior de este orgánulo), lo cual produce un aumento de la activación de la calcineurina [247]. Todas estas evidencias y tras comprobar que los mutantes Δcnb1 y Δcrz1 mostraban severas deficiencias de crecimiento en medios con concentraciones limitantes de K^+ (Fig. 58), hizo que nos decidiéramos a estudiar el papel de la calcineurina en la regulación del transporte de K^+ mediado por HpHak1.

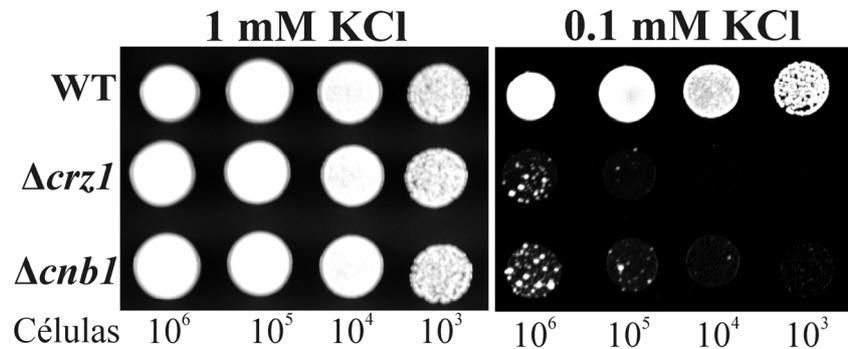


Figura 58. Los mutantes Δcrz1 y Δcnb1 crecen deficientemente en condiciones de déficit de K^+ . Las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios suplementados con las concentraciones indicadas de KCl, dejándose crecer durante 2 días a 37°C. El medio se tamponó a pH 5.8 con 50 mM MES-Tris.

2.6.1. La región promotora de *HAK1* presenta 2 secuencias putativas del tipo CDRE y una del tipo GATA.

La activación de la calcineurina produce la entrada en el núcleo de Crz1 y su unión a las secuencias CDRE presentes en las regiones promotoras de los genes diana para inducir su expresión [50]. La presencia de estas secuencias en regiones promotoras suele indicar que dichos genes podrían estar bajo el control del factor transcripcional Crz1. De esta forma decidimos buscar estas regiones en los promotores de *HAK1* y *TRK1* usando la matriz **cwmmGCCmC** generada por la aplicación informática Jaspar (jaspar.genereg.net) y el programa “Regulatory Sequence Analysis Tools WEB Interface” [299]. Identificamos dos posibles sitios CDRE en el promotor de *HAK1*, el primero entre las posiciones -215/-207 con una puntuación de 8 y el segundo entre las bases -163/-155 con una puntuación de 6. No se encontró ninguna secuencia CDRE en

TRK1. Así mismo, identificamos un único sitio de reconocimiento de factores GATA, utilizando para ello el mismo programa y la matriz **cyGATAAG** con una puntuación de 7.3 (Fig. 59).

```

AATAATTCCAGTGACAATCGCAATGAAGATCCCCTGACTTGCTAAGCGATTTATGAGAATAAGCCCTGTAAGCG
GTCAATGATAAGATGATAAATCTTCCAAGCATAATTGATGCAAACAATCTGAGATTTTTTCTGCTAGCGACT
ATTATTTTTTCAGGGCCATGACGTAAACTCTGCTGTTTAAACGAGGCTCGTTTTGCGCAATCGCAGGACCTAAAC
ACCATAAAAAATAGCGGAAAATTCGTTCAAATCCTGCTGCAAATCGAGAAATGCAACTCGCTATACTAGATCA
GTTACCGGTGCTCTCAGGCTCCGTAGGAGTGAGATCTTTGTTTTTTTCAAAGCCGTTGAACACTGTGCTACGC
GCCTACAACGTGCGAAATTTTTCGCCATGCACAGCCGTGAGCGAATTTTCGATCAACGTCTTTTTGTCTAATTA
TGGATCATTCGTGACAGCTGAACTCTGAATACCCTCACCAGGGCAAGAATTTGCTGAATTTGGGAATCCTACT
TTGTTTCACCGTAACGCTGGCTTCTATTGGCTGACTGTGGATGCGGAGCCTCCAAAATGCCTCAGATGGTGC
TTCTTAGAGACCTATAAAGGAGCTACAGCCTCCCTTTTCTAGCATATCGTAGTAACTACATGGTTTCTAAGGA
GGTAAGTATTCAAGCAGGAGTCTGAGGACCTAACACATACAGAGGCTAGGAAACGGACTAGGTGTCTCAA
ATGGCTTATGGCTCCGTGGG

```

Figura 59. La región promotora de *HAK1* presenta 2 putativas secuencias CDRE y una secuencia de unión a factores tipo GATA. Se representan 730 nt corriente arriba del ATG (subrayado). Las secuencias CDRE se presentan de color gris oscuro y la secuencia GATA de color gris claro.

2.6.2. El mutante $\Delta cnb1$ presenta bajos niveles de Hak1.

Tras comprobar que la interrupción de *CNB1* confería un mayor requerimiento de K^+ para crecer, estudiamos los niveles de Hak1-HA en medios sin K^+ en el mutante $\Delta cnb1$. Mediante inmunoblots determinamos que los niveles de Hak1 (Fig. 60) son casi

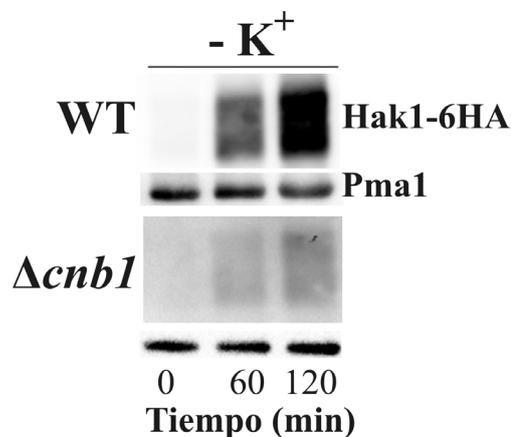


Figura 60. La cepa $\Delta cnb1$ presenta bajos niveles de Hak1-6HA. Inmunoblot de Hak1-HA. Las células se incubaron en un medio sin K^+ durante 120 min, tomándose muestras a los tiempos indicados. Pma1 se usó como control de carga.

indetectables en el mutante $\Delta cnb1$ tras 120 min de ayuno de K^+ , condiciones que provocan que en el WT ya haya una cantidad considerable de Hak1. Este hecho podría explicar el déficit de crecimiento de la cepa $\Delta cnb1$ a medios con bajo K^+ .

2.6.3. La cepa $\Delta gat1$ a diferencia de $\Delta gat2$, presenta bajos niveles de expresión y de proteína Hak1.

Teniendo en cuenta que: i), los niveles de Gat1 son regulados por la calcineurina; ii), que en el mutante $\Delta gat2$ los niveles intracelulares de Ca^{2+} son mayores; iii), y que la cepa $\Delta cnb1$ presenta bajos niveles de Hak1, decidimos estudiar la expresión de *HAK1* en las cepas $\Delta gat1$ y $\Delta gat2$ (Fig. 61A). La expresión de *HAK1* se reduce un 60% en la cepa $\Delta gat1$ en relación al WT. A diferencia de lo observado en el mutante $\Delta gat1$, la expresión en la cepa $\Delta gat2$ es casi el doble de la expresión del WT. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por inmunoblots (Fig. 61B), donde se observa que mientras los niveles de Hak1 son prácticamente indetectables en el mutante $\Delta gat1$, en la cepa $\Delta gat2$ son mayores que en la cepa WT.

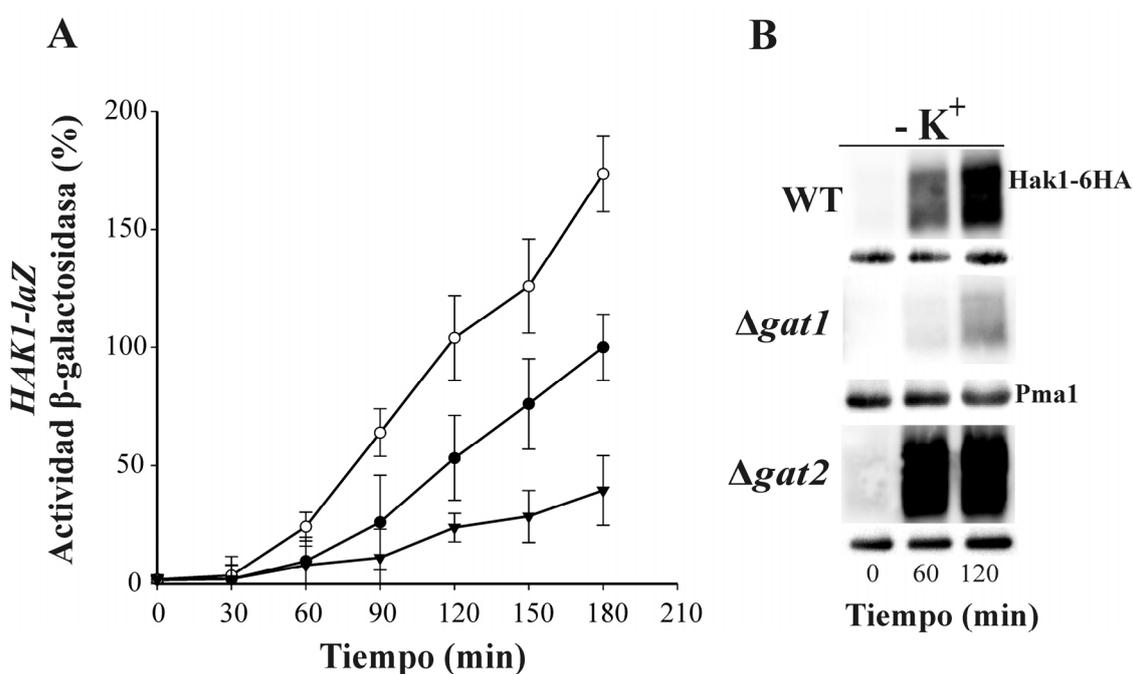


Figura 61. La interrupción de GAT1 y GAT2 afecta a los niveles de Hak1. Las cepas ensayadas se incubaron en un medio sin K^+ y se tomaron muestras para medir la actividad β -galactosidasa y para inmunoblots. **A.** La expresión de *HAK1* se determinó en las cepas WT (●), $\Delta gat1$ (▼) y $\Delta gat2$ (○) portadoras de la construcción *HAK1-lacZ*. El 100% de actividad se corresponde a valores de 634.5 ± 5.2 nmoles *o*-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹. **B.** Inmunoblots de Hak1 con anticuerpos anti-HA. Se usó Pma1 como control de carga.

También nos preguntamos si la calcineurina actúa sobre *HAK1* exclusivamente vía Crz1-Gat1, o también lo hace directamente a través de Crz1. Así, medimos los niveles de expresión de *HAK1* en medios sin K^+ pero con o sin 50 mM de $CaCl_2$ en el WT y en el mutante $\Delta gat1$ (Fig. 62). Observamos que se produce un incremento de la expresión de *HAK1* en $\Delta gat1$ en presencia de Ca^{2+} . Estos resultados nos sugieren que la inducción de *HAK1* no está únicamente mediada por la calcineurina-Crz1-Gat1, sino que existe una activación directa de Crz1 sobre *HAK1*. Este aumento en la expresión también se observa en el WT cuando le ponemos Ca^{2+} presumiblemente debido al mismo motivo, al igual que ocurre con *ENAI* [247].

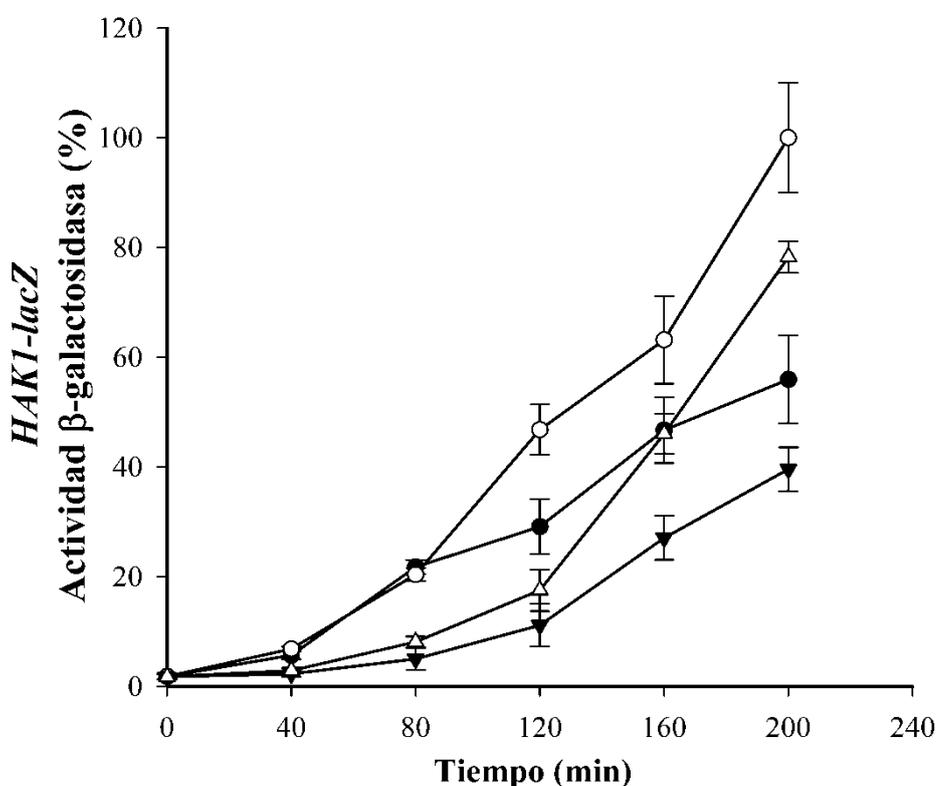


Figura 62. Efecto del Ca^{2+} en la expresión de *HAK1*. La actividad β -galactosidasa se cuantificó en el WT (●) y en $\Delta gat1$ (▼) incubados en un medio sin K^+ y en el mismo medio suplementado con 50 mM de $CaCl_2$ en WT (○) y en $\Delta gat1$ (Δ). El 100% de actividad corresponde a valores de 1319 ± 9.5 nmoles o-nitrofenol \cdot min $^{-1}$ \cdot mg proteína $^{-1}$.

2.7. Regulación postraduccional de Hak1.

Mediante el etiquetado de Hak1 con el epítipo HA decidimos estudiar si este transportador estaba sometido a algún tipo de regulación postraduccional. Es muy frecuente que junto con el control de la expresión de los transportadores de membrana,

las células posean mecanismos para actuar sobre el propio transportador. Esta regulación postraduccional permite una respuesta más rápida que la obtenida exclusivamente con el control transcripcional.

2.7.1. Los niveles de Hak1 están regulados por el K⁺.

Al igual que ocurre con la inducción del gen *HAK1*, la proteína Hak1 se induce en ausencia de K⁺ y su degradación es activada en presencia de este ión (Fig. 63). La desaparición de Hak1 en presencia de K⁺ nos llevó a estudiar los posibles mecanismos implicados.

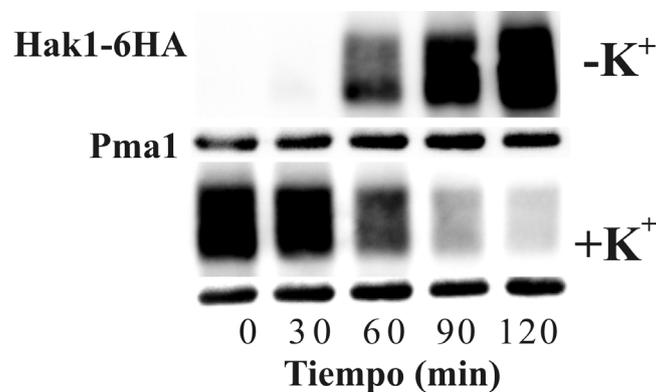


Figura 63. Hak1 se degrada en presencia de altas concentraciones de K⁺. Inmunoblot de Hak1 de células (WT) incubadas en un medio sin K⁺ durante 120 min (panel superior), para luego añadirles 20 mM de KCl durante otros 120 min (panel inferior). Pma1 se usó como control de carga.

2.7.2. Hak1 se degrada vía endocitosis y degradación vacuolar en presencia de K⁺.

Para conocer los mecanismos mediante los cuales Hak1 se degradaba en respuesta a K⁺ usamos algunos mutantes afectados en el tráfico intracelular de proteínas (afectados en la ruta endocítica y en la ruta de degradación vacuolar). Estudiamos la estabilidad de Hak1-HA en presencia de 20 mM de KCl en las cepas $\Delta end4$, $\Delta pep12$, $\Delta vps27$. End4 participa en las primeras fases de la endocitosis. Su interrupción bloquea la internalización de las proteínas presentes en la membrana plasmática pero no la llegada directa desde la ruta de secreción a la vacuola [241]. En el caso del mutante $\Delta pep12$ [107, 108] se bloquea el transporte de vesículas a nivel del endosoma tardío con lo que se consigue alterar la ruta directa de llegada a la vacuola así como la endocitosis de las proteínas presentes en la superficie celular. Vps27 es una proteína del endosoma

con múltiples funciones, entre las que destacan: reciclaje de proteínas del Golgi o entrada de proteínas ubiquitinadas en la vacuola para su degradación [146]. Por esta razón, en el mutante $\Delta vps27$ se bloquea la llegada a vacuola de las proteínas endocitadas y de aquellas que siguen una ruta directa desde el Golgi. En todas estas cepas los niveles de Hak1 son más altos que el WT (Fig. 64). La degradación de esta proteína está ralentizada, indicando que Hak1 es endocitado y degradado en la vacuola en presencia de K^+ .

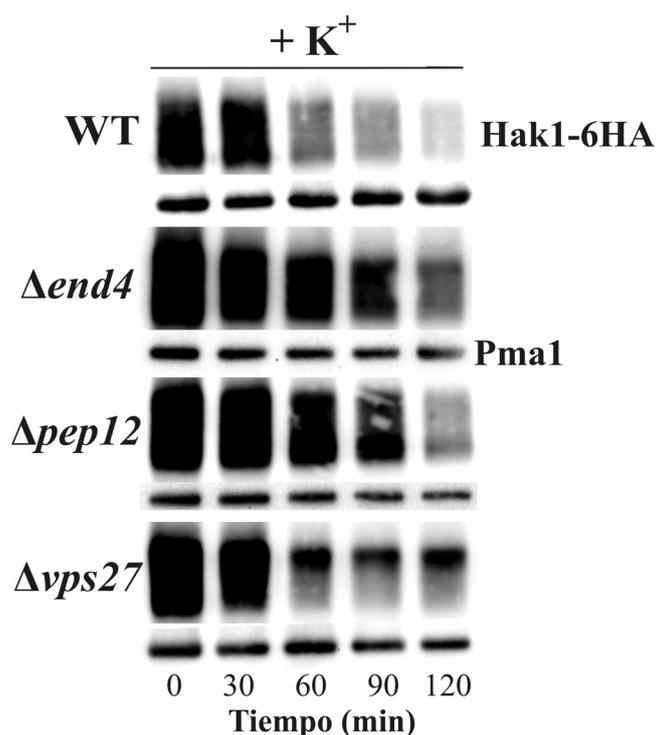


Figura 64. La delección de *END4*, *PEP12* y *VPS27* ralentiza la degradación de Hak1 aún en presencia de altas concentraciones de K^+ . Inmunoblot de Hak1-HA de células incubadas en un medio sin K^+ durante 120 min para luego añadirles 20 mM de KCl. Pma1 se usó como control de carga.

Estas observaciones coincidían con la localización celular de Hak1-GFP. En condiciones de ausencia de K^+ Hak1 se localiza en la superficie celular. Sin embargo, en respuesta a K^+ la fluorescencia va desapareciendo de la superficie celular y se va localizando en el lumen vacuolar (Fig. 65).

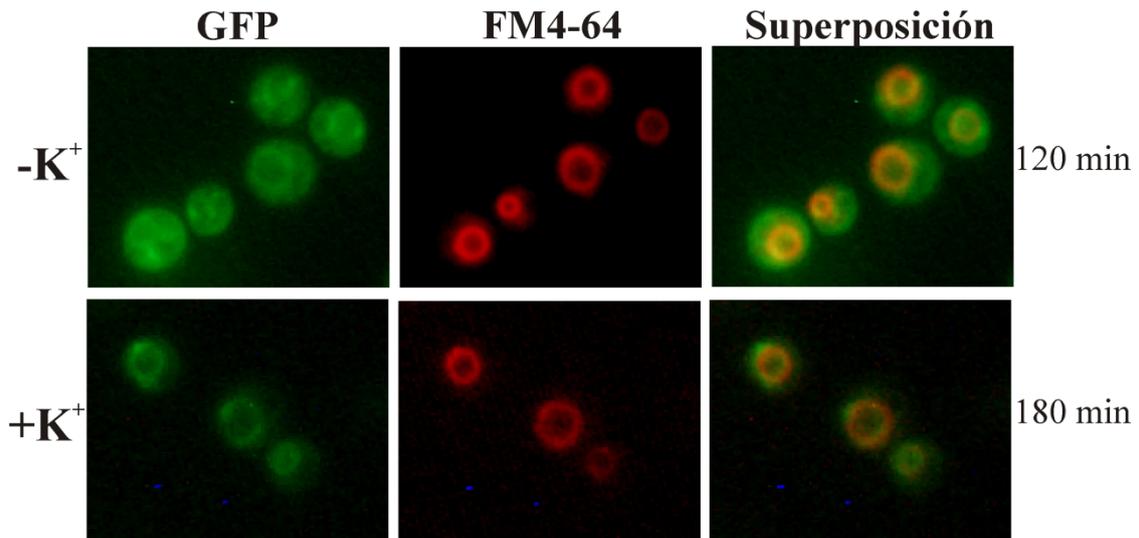


Figura 65. Hak1 se dirige a la vacuola en presencia de K⁺. Localización celular de la proteína de fusión Hak1-GFP en células incubadas en un medio sin K⁺ durante 120 min (panel superior) para luego añadirle 20 mM de KCl durante 180 min. Las membranas vacuolares se tiñeron con el colorante FM4-64. El panel de la derecha muestra la superposición de la localización de Hak1-GFP y la membrana vacuolar.

2.7.3. La ligasa de ubiquitina Rsp5 está implicada en la degradación de Hak1 en presencia de K⁺.

En las levaduras la unión covalente de una molécula de ubiquitina tiene un papel muy importante en el control de los niveles y la localización celular de los transportadores de la membrana plasmática. Muchas permeasas de levaduras encargadas de transportar una variedad de solutos diferentes son reguladas postraduccionalmente mediante ubiquitinación, constituyendo la señal que promueve la internalización de estas proteínas vía ruta endocítica seguida de proteólisis en la vacuola [118, 135]. En algunas de estas proteínas se ha encontrado que la ubiquitinación ocurre en la lisina de la secuencia consenso (D/E)XK(S/T) [82, 118, 135]. En Hak1 no se encontró una señal de estas características. En cambio, el análisis de Hak1 mediante el algoritmo *PESTfind* reveló una posible secuencia PEST (probabilidad de -1.33) en el extremo carboxilo terminal, en el que abundan residuos de prolina, ácido glutámico y aspártico, serina y treonina, característicos de este tipo de secuencias (Fig. 66). Es posible que la ubiquitinación de Hak1 ocurra en el residuos de lisina presente en esta secuencia.

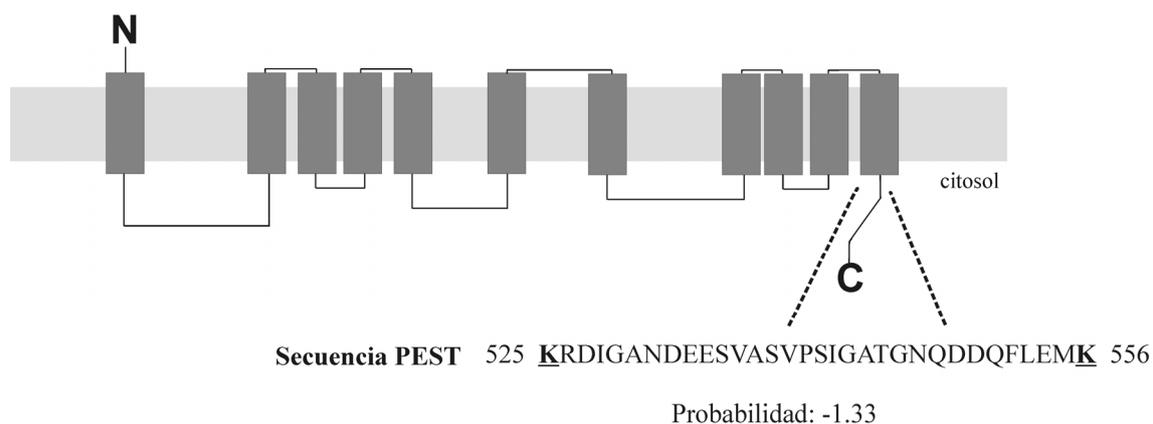


Figura 66. Identificación de una posible secuencia PEST en el extremo C-terminal citosólico de Hak1. *PESTfind* identifica secuencias PEST en proteínas, consideradas como secuencias peptídicas hidrofílicas iguales o mayores a 12 residuos que contienen al menos 1 prolina, 1 ácido glutámico o aspártico y 1 serina o treonina. Este fragmento debe estar flanqueado por una lisina, arginina o histidina, y no se permiten residuos cargados positivamente dentro de la región PEST. La puntuación para cada posible secuencia PEST oscila de -50 a +50; valores positivos indican una posible secuencia PEST, y superiores a +5 alta probabilidad de tratarse realmente de secuencias importantes en la degradación de la proteína (<https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind>).

En *S. cerevisiae* la ligasa de ubiquitina Rsp5 es la responsable de la ubiquitinación de la mayor parte de las proteínas de membrana [118], participa principalmente en la unión de la ubiquitina al sustrato. Su papel en la ubiquitinación y endocitosis de transportadores de membrana se identificó inicialmente en la permeasa general de aminoácidos Gap1 y en la permeasa de uracilo Fur4 [122]. Por ello decidimos estudiar los niveles de Hak1 en el mutante termosensible *rsp5-1*, el cual tiene sustituida la leucina 695 del dominio catalítico por serina, dando lugar a una forma de la proteína menos activa a temperaturas restrictivas, al igual que le ocurre al mutante de *S. cerevisiae* *rsp5-1*. Este mutante tiene sustituida la leucina 733 del dominio catalítico por serina [1].

Los niveles de Hak1 son más altos en presencia de K^+ en el mutante *rsp5-1* que en el WT y tarda mucho más tiempo en ser degradado (Fig. 67). Estos resultados indican que la ligasa de ubiquitina Rsp5 es importante para la degradación de Hak1 cuando el K^+ está presente.

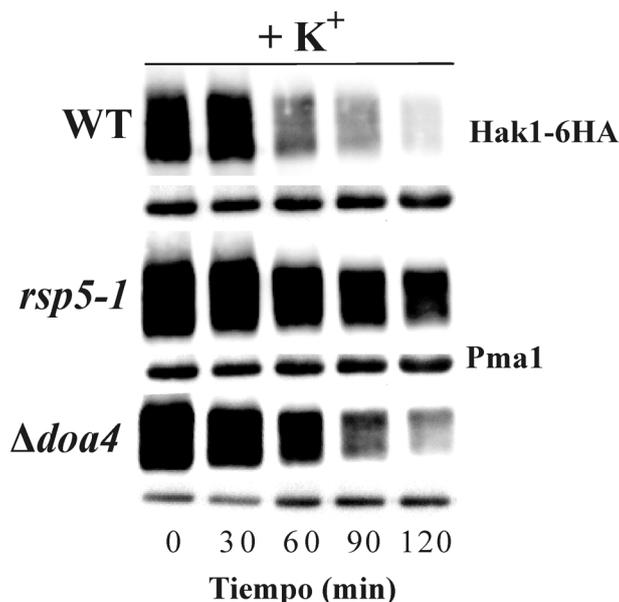


Figura 67. Hak1 es estable en el mutante termosensible *rsp5-1* y en menor medida en la cepa Δ *doa4* en presencia de altas concentraciones de K⁺. Inmunoblot de Hak1 de células incubadas en ausencia de K⁺ durante 120 min para luego añadirles 20 mM de KCl. Pma1 se usó como control de carga.

La enorme importancia de la hidrolasa de ubiquitina Doa4 en la regulación de varias permeasas de aminoácidos de *S. cerevisiae* nos hizo plantearnos su posible participación en la degradación de Hak1 en presencia de K⁺. Doa4 (o *UBP4*) forma parte de una importante familia de hidrolasas de ubiquitina de *S. cerevisiae* que hidrolizan los residuos de ubiquitina de las proteínas dianas [223, 224]. Esta enzima tiene un papel clave en el reciclaje de la ubiquitina de los sustratos destinados a la degradación proteolítica en el proteasoma o en la vacuola. La pérdida de la función de Doa4 produce un descenso de los niveles de ubiquitina libre, afectando a la ubiquitinación de numerosas proteínas [4, 287]. En un mutante Δ *doa4* se ha observado la deficiente endocitosis y degradación de numerosos transportadores de membrana como Gap1 [279] o Fur4 [81] o la deficiente entrada en el interior de la vacuola de Ste6 [173]. Sin embargo, en nuestro caso, no obtuvimos resultados tan espectaculares (Fig. 67). Los niveles de Hak1 son ligeramente mayores en el mutante Δ *doa4* en comparación con el WT, pero en ningún caso alcanza los niveles del mutante *rsp5-1*. Estos resultados sugieren que la participación de Doa4 en la regulación de Hak1 es secundaria. Posiblemente en el mutante Δ *doa4* los niveles de ubiquitina libre son lo suficientemente altos como para que Hak1 se degrade.

2.7.4. La quinasa de proteínas Npr1 regula los niveles de Hak1.

En *S. cerevisiae*, Npr1 forma parte de una familia de quinasas de proteínas que comparten un dominio catalítico muy similar. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran las quinasas Hal4/5, que como ya hemos mencionado, participan en el control del transportador de potasio Trk1 [228]. El descenso en los niveles de transporte de potasio produce un aumento de la sensibilidad a cationes tóxicos como: Li^+ , Na^+ o higromicina B. Esto es consecuencia de una mayor entrada de los mismos en el interior celular debido al aumento del potencial de membrana. Por lo tanto, estas quinasas de proteínas tienen un papel central en el ajuste de los parámetros biofísicos básicos de la célula en respuesta a cambios en las condiciones del medio. Npr1 podría participar en la regulación del transporte de potasio en *H. polymorpha*. La interrupción de *NPR1* causa severas deficiencias de crecimiento en presencia de Na^+ , Li^+ e higromicina B y en medios con concentraciones limitantes de K^+ . Además $\Delta npr1$ presenta un menor transporte de potasio de alta afinidad [185]. Por ello, estudiamos si Npr1 regulaba de alguna forma los niveles de Hak1.

2.7.4.1. Npr1 participa en la regulación postraduccional de Hak1.

Con el fin de descartar que Npr1 actuara regulando la expresión de *HAK1*, se analizaron los niveles de expresión de *HAK1-lacZ* en el mutante $\Delta npr1$. La figura 68 muestra que los niveles de expresión del mutante $\Delta npr1$ son similares a los obtenidos en la cepa silvestre, indicando que Npr1 no regula la transcripción de *HAK1*.

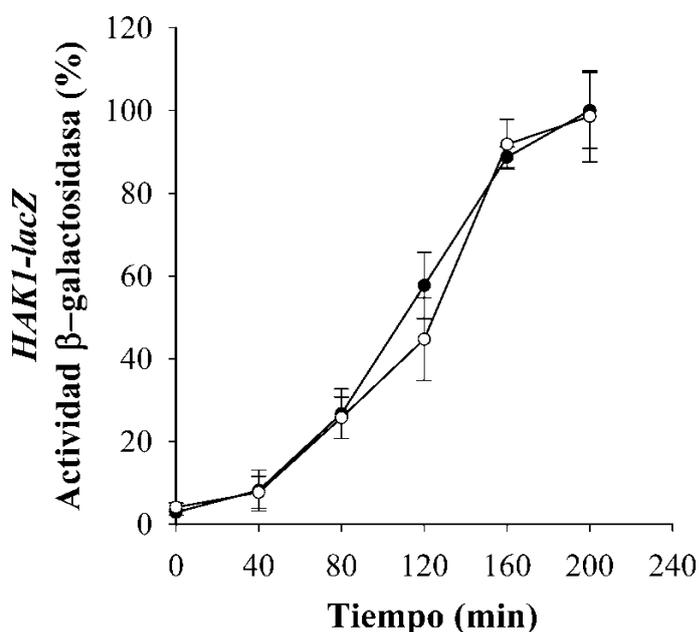


Figura 68. La expresión de *HAK1* no está afectada en el mutante $\Delta npr1$. Se determinó la expresión de *HAK1-lacZ* en el WT (●) y en el mutante $\Delta npr1$ (○) en ausencia de K^+ . El 100% de actividad β-galactosidasa se corresponde a valores de 439 ± 9.1 nmoles o-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹.

2.7.4.2. Npr1 regula los niveles de Hak1.

Tras comprobar que la expresión de *HAK1* no se veía afectada por la delección de *NPR1*, decidimos analizar los niveles de Hak1 en el mutante $\Delta npr1$ y en una cepa portadora de varias copias de este gen, denominada *nNPR1* (Fig. 69). Los niveles de Hak1 son considerablemente menores en la cepa $\Delta npr1$ tras ser incubados en un medio sin K^+ . Por el contrario, en la cepa que sobreexpresa *NPR1*, la cantidad de Hak1 es mucho mayor a la observada en el WT. Este resultado sugiere que Npr1 actúa regulando los niveles de Hak1, puede que actúe al igual que Hal4/5, controlando la localización celular de Hak1.

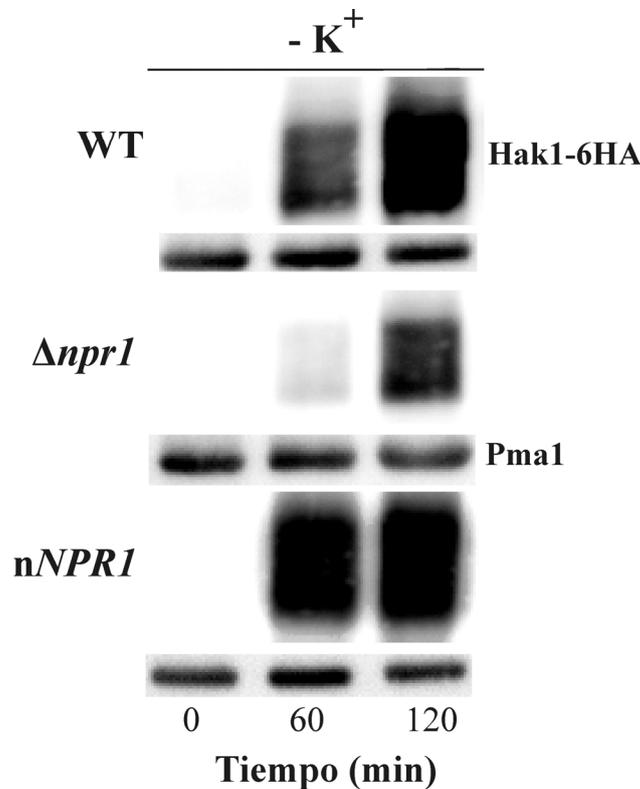


Figura 69. Niveles de Hak1 en el mutante $\Delta npr1$ y en la cepa *nNPR1*. Inmunoblot de Hak1-HA de células incubadas en ausencia de K^+ durante 120 min. Pma1 se usó como control de carga.

2.7.4.3. Hak1 tiene residuos susceptibles de fosforilación.

Hak1 es una proteína de unos 100 kDa que según programas informáticos posee un largo C-terminal citosólico. Según la aplicación informática NetPhos 2.0. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (Fig. 70) se han predicho unos 14 residuos de serina como sitios potenciales de fosforilación. Entre ellos destacan 6 residuos con

una puntuación superior a 0.9 que se encuentran en el extremo carboxilo citosólico. En esta región son frecuentes los residuos potencialmente fosfoaceptores (S/T/Y), algunos de ellos formando parte de posibles sitios de fosforilación de proteína kinasa A, C y caseína kinasa II según las predicciones (Tabla 6).

Tabla 6. Características de los residuos fosfoaceptores de Hak1 y posibles quinasas implicadas.

Herramienta	Tipo de señal	Posición	Secuencia	Probabilidad
NetPhos ^a	Fosforilación	S496	SFKKSIDEL	0.964
	Fosforilación	S523	NSDTSKKRD	0.996
	Fosforilación	S613	EPRVSTLPF	0.922
	Fosforilación	S623	EEEESYRLQ	0.983
	Fosforilación	S661	SLLLSIPEI	0.969
	Fosforilación	S743	ISNNST MDF	0.979
	Fosforilación	T522	LNSDTSKKR	0.632
	Fosforilación	T582	STALTNRSC	0.647
NetPhosK ^b	Fosforilación	T698	REYVTSKTY	0.573
	PKA	S496	SFKKSIDEL	0.60
	PKC	S523	NSDTSKKRD	0.76
	PKA	S613	EPRVSTLPF	0.60
	CKII	S623	EEEESYRLQ	0.52
	CKII	S661	SLLLSIPEI	0.62
	PKC	T582	STALTNRSC	0.84

^a, identifica sitios genéricos de fosforilación teniendo en cuenta las correlaciones entre los residuos que rodean al posible residuo fosfoaceptor. Esta herramienta está construida a partir de una base de datos de proteínas donde se han identificado experimentalmente los sitios de fosforilación (Phosphobase, <http://phospho.elm.eu.org/>). Para cada residuo fosfoaceptor (S, T, Y) el programa compara la secuencia circundante con un logo que incluye 12 residuos hacia los extremos amino y carboxilo en donde se resaltan los residuos que son encontrados más frecuentemente en las secuencias de la base de datos. Este logo no constituye un determinante específico para un única kinasa, sino que en cambio recoge todas las características de los sitios de fosforilación verificados experimentalmente (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

^b, identifica sitios específicos para quinasas en proteínas eucariotas en base a conjuntos de sitios de fosforilación de S, T e Y validados experimentalmente. PKA, proteína kinasa dependiente de AMP cíclico; PKC, proteína kinasa C; CKII, caseína kinasa II.

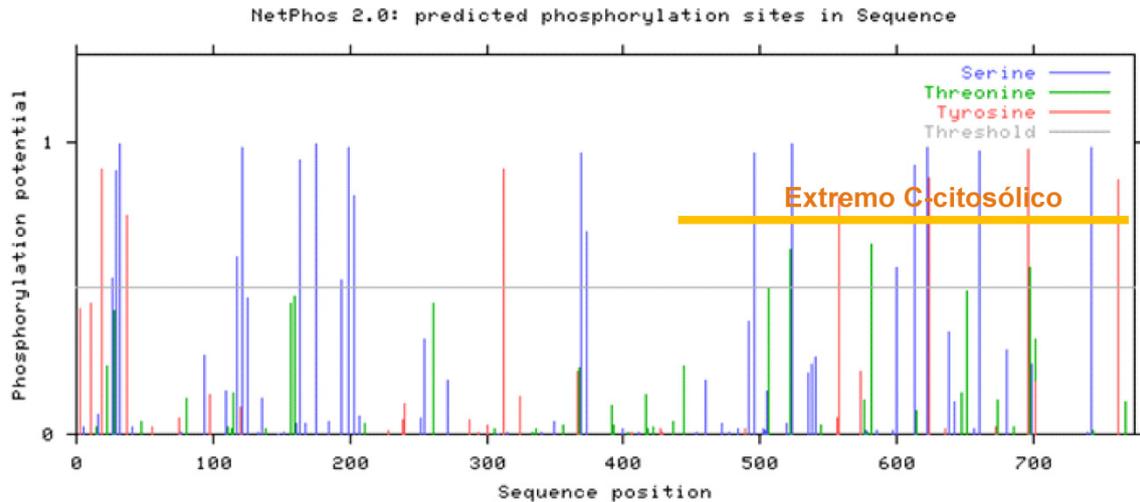


Figura 70. Distribución en la proteína y probabilidad de putativos sitios de fosforilación de Hak1 según el programa NetPhos v2.0. Las barras verticales corresponden a posibles residuos fosfoaceptores en la secuencia de Hak1 (S, azul; T, verde; Y, rojo). La altura de la barra indica la puntuación que calcula el programa para cada residuo. En naranja se señala la región correspondiente al extremo C-terminal de Hak1.

2.7.4.4. La fosforilación de Hak1 no es regulada por Npr1.

Al observar los inmunoblots de Hak1 en las distintas cepas ensayadas se intuía la presencia de una banda con una movilidad electrofóretica menor. Para determinar si este retraso era debido a la fosforilación de la proteína utilizamos λ -proteína fosfatasa (Fig. 71). El tratamiento con λ -proteína fosfatasa mostró que se trataba de formas fosforiladas del transportador pues la banda superior (fosforilada) desaparecía tras el tratamiento con λ -proteína fosfatasa (segundo carril). Esto no ocurría cuando a la reacción de desfosforilación se le añadía EDTA (tercer carril). El EDTA actúa como inhibidor de la fosfatasa al quelar el cofactor Mn^{+2} de la enzima.

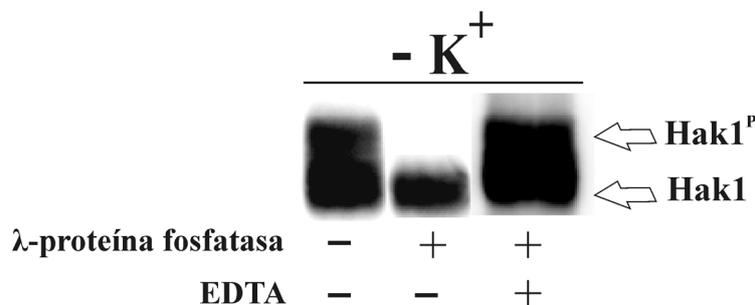


Figura 71. Hak1 presenta una banda más retrasada que corresponde con una forma fosforilada de la misma. Tratamiento con λ -proteína fosfatasa (+ tratadas, - sin tratar) de extractos proteicos obtenidos a partir de células incubadas en ausencia de K^+ durante 120 min. Se añadió 100 mM de EDTA para inhibir la actividad de la λ -proteína fosfatasa.

Estas formas fosforiladas parecían estar relacionadas con la ausencia de K^+ , su presencia parecía estar relacionada con la inducción de Hak1 por ausencia de este catión. En el inmunoblot que se muestra (Fig. 72), donde tras inducir la expresión de Hak1 durante 120 min en un medio sin K^+ , le añadimos 50 mM de KCl, la banda superior (fosforilada) es la primera que empieza a desaparecer y tras 45 min ya no la detectamos. Este resultado podría atribuirse a que la banda fosforilada se encuentra en menor cantidad y por lo tanto, desaparecería antes. En la muestra de tiempo 0 min (justo tras añadirle el K^+) la relación entre la banda fosforilada y la no fosforilada es similar. Estos resultados sugieren que la aparición de la banda fosforilada de Hak1 puede estar relacionada con la ausencia de K^+ . Sin embargo, desconocemos si está relacionada con la función y/o estabilidad en la superficie celular de Hak1.

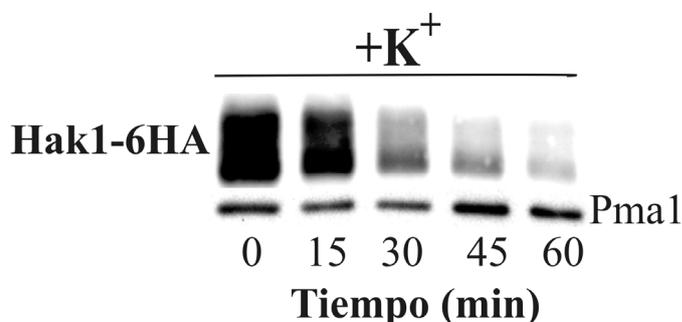


Figura 72. La fosforilación de Hak1 es dependiente del K^+ . Inmunoblot de Hak1-HA de células incubadas en ausencia de K^+ durante 120 min, para luego añadirles 50 mM de KCl. Pma1 se usó como control de carga.

Con el fin de seguir indagando sobre el posible papel regulador de Npr1 sobre Hak1, estudiamos el estado de fosforilación de Hak1 en ausencia de K^+ en el mutante $\Delta npr1$ (Fig. 73). Como ya hemos mencionado, una forma silvestre de Hak1 se fosforila en medios carentes de K^+ . Comparamos la movilidad electroforética de Hak1 en la cepa

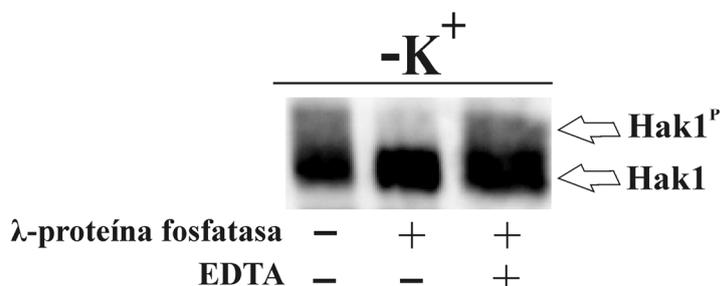


Figura 73. Hak1 se fosforila en el mutante $\Delta npr1$. Extractos totales de células incubadas en ausencia de K^+ durante 120 min se trataron con λ-proteína fosfatasa y se detectó la migración electroforética de la banda reconocida por anticuerpos anti-HA. Se añadió 100 mM de EDTA para inhibir la actividad de la λ-proteína fosfatasa.

$\Delta npr1$ de extractos tratados y sin tratar con λ -proteína fosfatasa. Se puede observar como en el mutante $\Delta npr1$, Hak1 se sigue fosforilando, aunque en menor medida. Puede que Npr1 no regule los niveles de Hak1 por medio de la fosforilación directa o indirecta de Hak1.

2.8. La fosforilación de Npr1 es regulada por el K^+ .

Nuestro grupo ha mostrado que la actividad de Npr1 está regulada en función de las condiciones nutricionales de la célula mediante un mecanismo de fosforilación, de tal manera que en presencia de fuentes preferentes de nitrógeno o ausencia de glucosa la proteína se encuentra fosforilada y presumiblemente inactiva. Este estado fosforilado de Npr1 se correlaciona con los niveles de Ynt1, que en presencia de glutamina o ausencia de glucosa caen de forma rápida. En cambio, en medios sin fuente de nitrógeno o con nitrato la migración de Npr1 es mucho más rápida, y en estas condiciones Ynt1 se encuentra fosforilado, y por tanto, es mucho más estable [187].

Es por ello que estudiamos si el estado de fosforilación de Npr1 variaba en presencia o ausencia de K^+ . Para ello incubamos la cepa HA-Npr1 en un medio carente de K^+ y en un medio suplementado con 20 mM de KCl durante 120 min (Fig. 74A). La incubación en un medio carente de K^+ repercutía en la velocidad de migración de HA-Npr1 que era significativamente más lenta que la observada en presencia de K^+ .

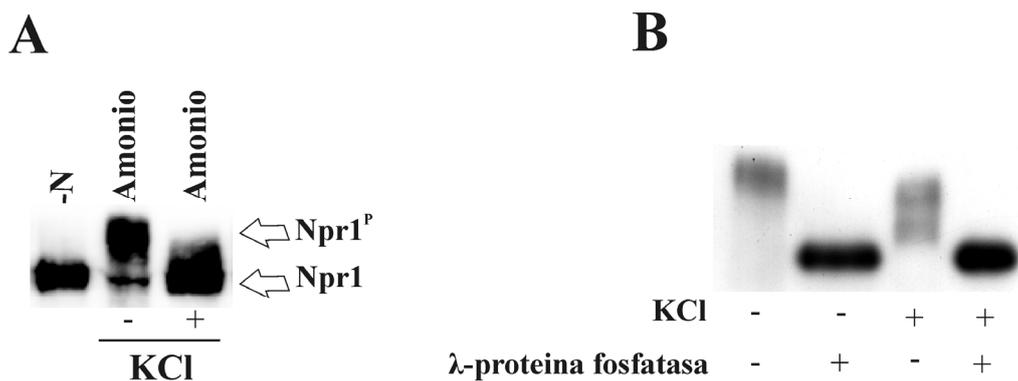


Figura 74. La ausencia de K^+ aumenta la fosforilación de Npr1. **A.** La ausencia de K^+ altera la movilidad electroforética de HA-Npr1. Las células se incubaron en 30 mM de sulfato de amonio con o sin 20 mM de KCl durante 2 horas y en un medio sin fuente nitrogenada durante 1 hora. **B.** Npr1 se fosforila al incubar las células en un medio sin K^+ . Extractos totales de células incubadas con 20 mM de KCl o en ausencia de K^+ durante 120 min, se trataron con λ -proteína fosfatasa y se detectó la migración electroforética de la banda reconocida por anticuerpos anti-HA.

La siguiente cuestión que nos planteamos fue identificar si el retraso electroforético de Npr1 en medios sin K^+ se correspondía con formas fosforiladas de la proteína. El tratamiento de los extractos con λ -proteína fosfatasa de células incubadas en medios con y sin K^+ causó el mismo aumento de movilidad de HA-Npr1, es decir, tras el tratamiento con λ -proteína fosfatasa la movilidad alcanzada por HA-Npr1 fue la misma independientemente de la presencia o no de K^+ (Fig. 74B).

Estos resultados indican una vez más que la fosforilación es la principal modificación de Npr1, y que un cambio en las condiciones del medio repercute en el estado de fosforilación de Npr1. Sin embargo, si relacionamos los patrones de fosforilación de HA-Npr1 con los niveles de Hak1, observamos que en medios sin K^+ , Hak1 está en la superficie celular y Npr1 está más fosforilado, en cambio, en medios con K^+ , aunque Npr1 se encuentra menos fosforilado, los niveles de Hak1 caen drásticamente. Los patrones de fosforilación de Npr1 están relacionados con su participación en la regulación de numerosas permeasas de aminoácidos [267]. Así, la forma activa (defosforilado) e inactiva (fosforilado) de Npr1 descrita para el caso de permeasas implicadas en el transporte de fuentes de nitrógeno no preferentes (como Gap1 e Ynt1) no se correlaciona con los niveles de Hak1 [187, 267]. En estos casos, una forma defosforilada de Npr1 (estado activo) se corresponde con altos niveles de Ynt1 y Gap1 en la superficie celular, mientras que una forma inactiva de la enzima, conlleva el envío a vacuola de estas permeasas [76, 187] Debido a esto, decidimos estudiar qué efecto tendría la ausencia de potasio sobre la fosforilación de Npr1 en medios con distintas fuentes nitrogenadas. Para ello utilizamos desde fuentes preferentes como la glutamina, hasta fuentes no preferentes como el nitrato e incluso medios sin ninguna fuente nitrogenada. Los cambios en la movilidad electroforética de HA-Npr1 motivados

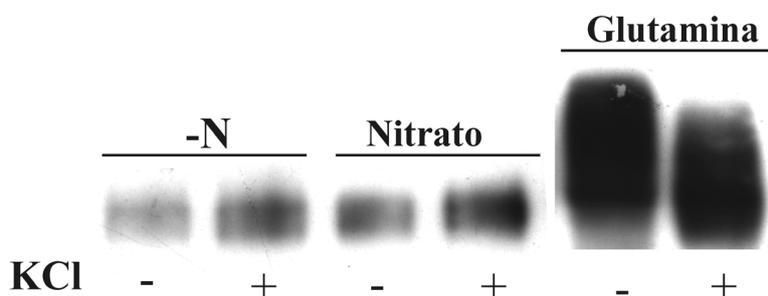


Figura 75. Efecto del K^+ sobre la fosforilación de Npr1 en distintas fuentes nitrogenadas. Las células se incubaron en ausencia de nitrógeno (-N), en 5 mM de nitrato y en 5 mM de glutamina con o sin 20 mM de KCl durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se recogieron muestras para realizar el inmunoblot usando anticuerpos anti-HA.

por la ausencia de K^+ (Fig. 75), solamente los observamos en presencia de glutamina, al igual que ocurre con amonio; sin embargo, en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno (-N), no se observó ninguna modificación electroforética. En estos casos, la ausencia de K^+ no produce variaciones en los patrones de fosforilación de HA-Npr1, las variaciones producidas por las fuentes nitrogenadas sobre el patrón de fosforilación de Npr1 priman sobre la presencia o no de K^+ . Es de destacar que el efecto del K^+ sobre Npr1 solo se aprecia cuando hay fuentes nitrogenadas preferentes como el amonio o la glutamina. El hecho de que este patrón de fosforilación sea observado en glutamina nos permitió descartar que se deba a problemas de competencia en la entrada de amonio y K^+ como han sido descritos [126].

No obstante, para descartar que la regulación de Npr1 sobre Hak1 sea independiente de la fuente de nitrógeno y por tanto de su fosforilación, se estudiaron los niveles de Hak1 en ausencia de K^+ pero en presencia de glutamina (como fuente preferente) y en ausencia de una fuente nitrogenada (Fig. 76). Los niveles de Hak1 son muchos más altos en ausencia de nitrógeno que en presencia de glutamina, donde Hak1 empieza a desaparecer incluso antes de añadirle K^+ . Además parece que la degradación de Hak1 con K^+ y en ausencia de nitrógeno es más lenta. Este resultado nos indica que la regulación de Hak1 si depende del tipo de fuente nitrogenada, de forma que las fuentes nitrogenadas preferentes repercuten negativamente en los niveles de Hak1, condiciones en las que Npr1 se encuentra fosforilado.

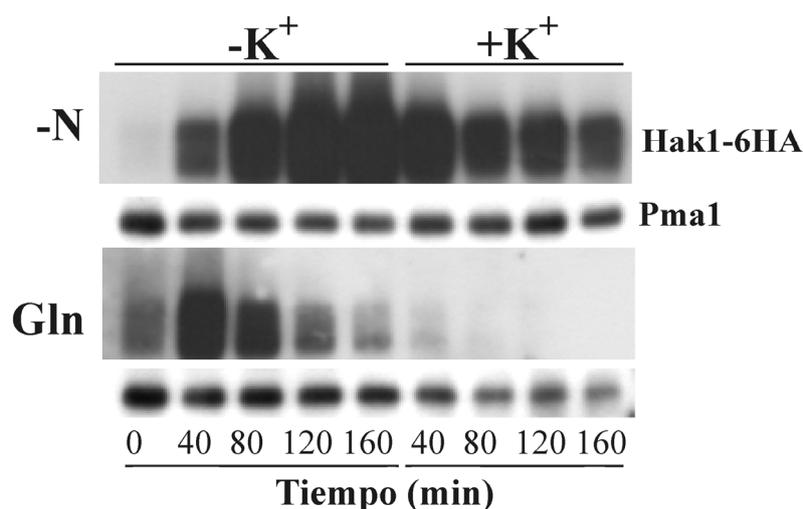


Figura 76. Efecto de las fuentes nitrogenadas en los niveles de Hak1. Las células se incubaron en un medio sin K^+ y en ausencia de nitrógeno (-N) y en 5 mM de glutamina (Glu) durante 160 min. Tras este tiempo se añadió 20 mM de KCl. A los tiempos indicados, se recogieron muestras para realizar el inmunoblot usando anticuerpos anti-HA y anti-Pma1. La imagen del panel inferior (Gln) se tomó tras 15 min de exposición, mientras que la imagen superior (-N) se tomó tras 5 min de exposición.

2.9. La rapamicina aumenta la expresión de *HAK1* en presencia de K^+ .

En *S. cerevisiae* el tratamiento con el inhibidor de la quinasa TOR, la rapamicina, causa la desfosforilación de Npr1 en cualquier tipo de fuente de nitrógeno. Este resultado permitía relacionar esta ruta de señalización celular con Npr1 y, por ende, con la regulación de numerosas permeasas de aminoácidos [267]. La rapamicina presente en el medio inhibe específicamente esta ruta de señalización que, entre otros múltiples efectos, mimetiza una situación de ayuno de nitrógeno en la célula [71]. Este comportamiento bien establecido en *S. cerevisiae* se cumple solo parcialmente en otros organismos en los que la rapamicina tiene consecuencias dispares.

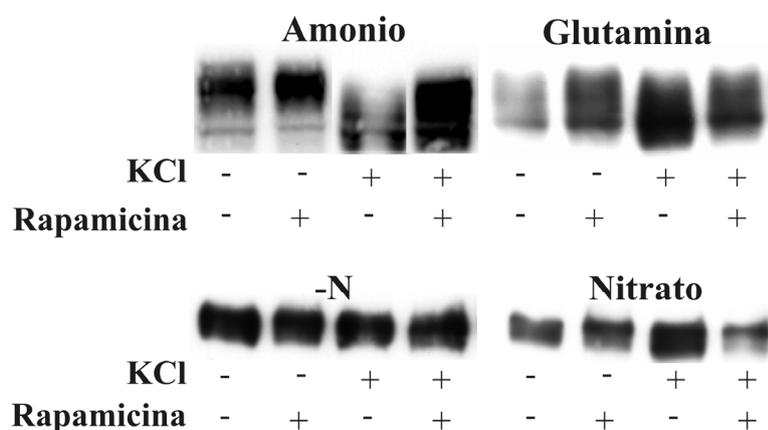


Figura 77. El tratamiento con rapamicina altera la fosforilación de Npr1 en presencia de K^+ y de fuentes nitrogenadas preferentes. Las células se incubaron en 5 mM de amonio, glutamina y nitrato y en ausencia de nitrógeno con o sin 20 mM de KCl durante 2 horas y con y sin 2 μ M de rapamicina.

En *H. polymorpha* la rapamicina no parece afectar al crecimiento de la levadura. Sin embargo, su presencia en concentraciones superiores a 0.5 μ M afecta a la ruta de represión catabólica por nitrógeno, causando la desrepresión de los genes sometidos a esta regulación transcripcional independientemente de la fuente de nitrógeno del medio [211]. Además más recientemente se ha demostrado que la rapamicina protege de la degradación de Ynt1 en ausencia de glucosa pero no de la degradación provocada por la glutamina [187]. En base a estos resultados decidimos analizar el estado de fosforilación de Npr1 en presencia de rapamicina en medios con y sin K^+ y en distintas fuentes nitrogenadas. En la figura 77 se muestra la movilidad electroforética de HA-Npr1 en células incubadas en medios sin K^+ o con 20 mM de KCl a los que se les añadió 2 μ M de rapamicina. En estas condiciones observamos como la movilidad electroforética de Npr1 cambia en las células incubadas con K^+ cuando se le

añade rapamicina, pero solo en las células incubadas en amonio y en glutamina. El patrón observado es similar al que se obtiene al incubar las células en ausencia de K^+ . En cambio, la rapamicina en medios carentes de K^+ no produce ningún efecto independientemente de la fuente nitrogenada. En presencia de nitrato y en medios sin fuente nitrogenada no se observa ninguna modificación en la movilidad de Npr1. Estos resultados sugieren que la rapamicina es capaz de simular situaciones de ayuno de K^+ en presencia de fuentes nitrogenadas preferentes.

Basándonos en estos resultados analizamos cómo era la expresión del gen *HAK1* en presencia de K^+ y rapamicina, pues si la rapamicina mimetiza situaciones de ayuno de K^+ , se debería ver reflejado en los valores de expresión del gen *HAK1*. Así utilizando la construcción *HAK1-lacZ* medimos la expresión de este transportador en medios con 5 y 10 mM de KCl en presencia y en ausencia de 2 μ M de rapamicina. Observamos (Fig. 78) como casi no se detectaba expresión de *HAK1* en los medios con 5 y 10 mM de KCl tras 240 min de incubación. En cambio, en los medios que además de K^+ tenían rapamicina, si se detectaba expresión de *HAK1*, confirmando que efectivamente la rapamicina es capaz de simular situaciones de ayuno de K^+ , causando una desrepresión constitutiva de *HAK1* independientemente de la presencia de K^+ en el medio. Estos resultados apuntan que la vía TOR podría regular de forma negativa la expresión de *HAK1*.

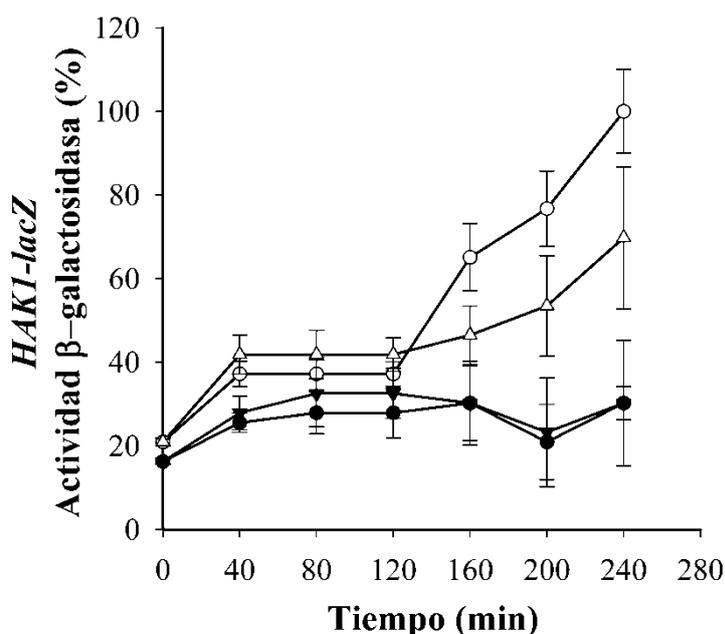


Figura 78. *HAK1* se expresa en presencia de K^+ y de rapamicina. Se determinó la expresión de *HAK1-lacZ* en un WT en 5 mM de K^+ (●) sin y con 2 μ M de rapamicina (○) y en 10 mM de K^+ (▼) sin y con rapamicina (Δ). El 100% de actividad se corresponde a valores de 56 ± 2.6 nmoles o-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹.

Para descartar que el efecto de la rapamicina sobre la expresión de *HAK1*, el cual lo vemos en presencia de K^+ , se deba a un problema en la entrada del mismo, de forma que al no entrar este catión, se produciría la expresión de *HAK1*, realizamos un test de crecimiento en medios con 1 mM de KCl y 5 μ M de rapamicina llevando entre otros el mutante $\Delta hak1$. Si la rapamicina interfiriese negativamente con la entrada de K^+ , el crecimiento del mutante $\Delta hak1$ debería verse afectado. Si esto no sucediese, podríamos descartar que el efecto de la rapamicina sobre la expresión de *HAK1* se deba a un problema con la entrada de K^+ . Como se recoge en la figura 79, la cepa $\Delta hak1$ crece de manera similar en presencia o no de rapamicina, con lo cual, podemos afirmar que la rapamicina no interfiere con el transporte de K^+ , pero si en simular situaciones de ayuno de potasio.

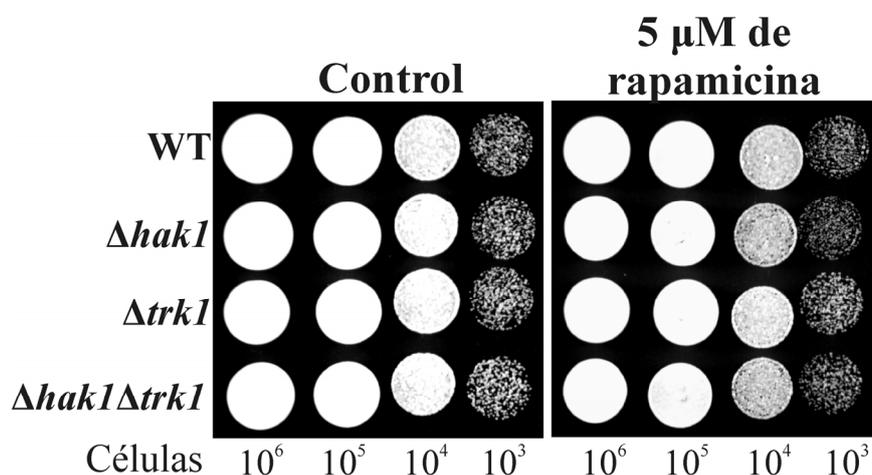


Figura 79. El crecimiento de los mutantes $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$ no se ve afectado por la presencia de rapamicina. Las cepas indicadas se sembraron por goteo en medios con 1 mM de KCl y 5 μ M de rapamicina, dejándose crecer durante 2 días a 37°C. Las placas se tamponaron a pH 5.8 con 50 mM MES-Tris.

2.10. La ausencia de K^+ afecta al transporte de nitrato de alta afinidad.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las quinasas Hal4 y Hal5 estabilizan el transportador de potasio ScTrk1 en la superficie celular, de manera que la interrupción de estos genes causa la degradación vacuolar de la proteína [228]. Sin embargo, también se ha visto que Hal4/5 participan en la estabilidad de otras proteínas de membrana como Can1 (permeasa de arginina), Fur4 (permeasa de uracilo), Hxt1 (permeasa de glucosa de baja afinidad) y Gap1 en condiciones limitantes de K^+ [228, 229]. Teniendo esto en cuenta junto con el hecho de que la ausencia de K^+ causa un aumento de la fosforilación de Npr1, similar al que se obtiene al incubar las células en Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

presencia de glutamina, decidimos estudiar la estabilidad del único transportador de nitrato de alta afinidad de *H. polymorpha*, Ynt1, si se veía afectado por la ausencia de K^+ .

2.10.1. La ausencia de K^+ no afecta a la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato.

Con el fin de analizar si el K^+ pudiera actuar en la regulación de los genes de la vía de asimilación de nitrato, estudiamos la expresión de *YNR1-lacZ* en el mutante $\Delta ynr1$ en medios con 100 μM de nitrato y en presencia o en ausencia de K^+ . Los valores de actividad β -galactosidasa (Fig. 80) reflejan como la ausencia de K^+ no afecta a los niveles de expresión del gen *YNR1* y por ende, a el resto de los genes de la vía.

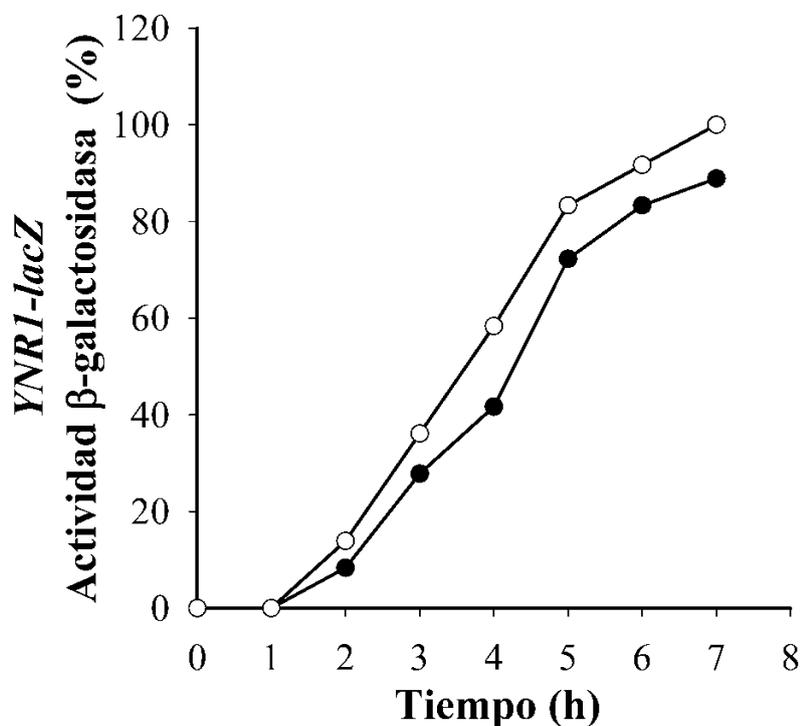


Figura 80. Efecto del K^+ en la expresión de *YNR1*. Se determinó la expresión de *YNR1* midiendo la actividad β -galactosidasa en la cepa $\Delta ynr1$ portadora de la construcción *YNR1-lacZ* en 100 μM de nitrato con 20 mM de KCl (●) y sin K^+ (○). El 100% de actividad se corresponde a valores de 124 nmoles o-nitrofenol·min⁻¹·mg proteína⁻¹. El ensayo fue repetido tres veces sin diferencias significativas.

2.10.2. La ausencia de K^+ afecta negativamente el transporte de nitrato de alta afinidad.

Tras determinar que la ausencia de K^+ no afectaba la expresión de los genes inducidos por nitrato, nos planteamos si el de ayuno de K^+ podría afectar a otro

elemento de la vía. Por ello determinamos el consumo de nitrato en una cepa silvestre y en el mutante $\Delta hak1$ en presencia y en ausencia de K^+ . Empleamos el mutante $\Delta hak1$ para asegurarnos completamente una situación de ayuno de potasio. De los valores de consumo obtenidos (Fig. 81) observamos cómo incluso en el WT se produce una reducción del consumo de nitrato en ausencia de K^+ , siendo mucho más pronunciada esta diferencia en el mutante $\Delta hak1$. La cepa $\Delta hak1$ en presencia de K^+ no llega a alcanzar los valores de consumo de nitrato del WT en las mismas condiciones. Sin embargo, en ausencia de K^+ , se produce un retraso mucho más pronunciado del consumo de nitrato, la cepa $\Delta hak1$ consume únicamente un 20% del nitrato presente en el medio tras 90 min de incubación.

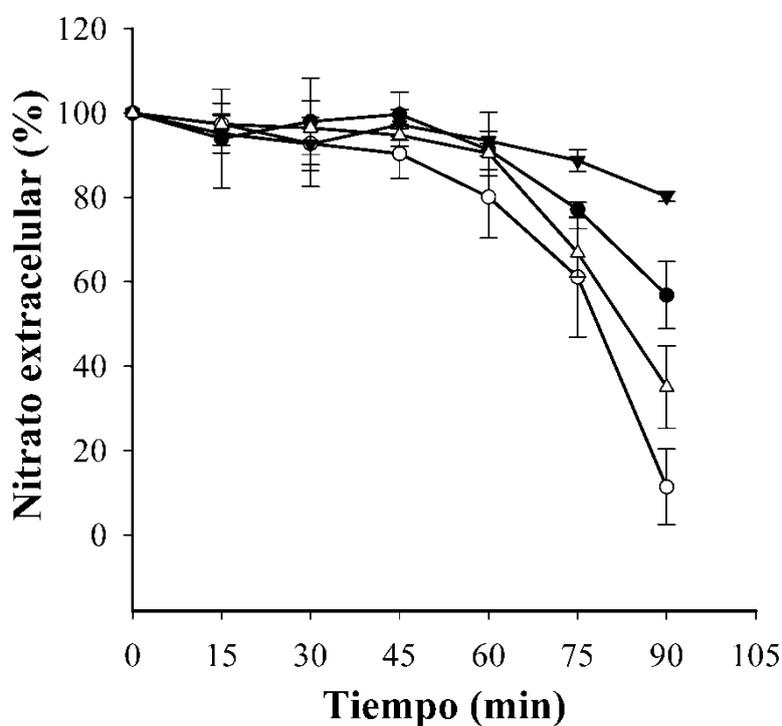


Figura 81. Papel del K^+ en el consumo de nitrato. Consumo de nitrato en WT sin K^+ (●), WT más 20 mM KCl (○), $\Delta hak1$ sin K^+ (▼) y $\Delta hak1$ más K^+ (Δ). Las células se crecieron en 5 mM de amonio, y se sometieron a un medio sin fuente de nitrógeno durante 120 min, antes de adicionar 0.5 mM de nitrato. Los valores de consumo de nitrato están expresados en porcentaje.

Estos resultados parecen indicar que el K^+ es importante en la vía de asimilación de nitrato, pero no regulando la expresión de los genes inducidos por nitrato. Todas estas observaciones sugieren que Ynt1 se ve afectado por la ausencia de K^+ .

Para estudiar si el defecto observado por la ausencia de K^+ en el consumo de nitrato, se debía a que la falta de este catión afectaba al tráfico intracelular de Ynt1 (a su llegada a la membrana plasmática) en presencia de nitrato, planteamos el siguiente experimento. Este ensayo nos daba información de la llegada de Ynt1 a la membrana plasmática (Fig. 82). Las células previamente ayunadas de nitrógeno, se incubaron en 0.5 mM de nitrato en presencia y en ausencia de K^+ y se tomaron muestras tras 75 y 90 min de incubación para medir el transporte de nitrato de alta afinidad. Los valores de transporte obtenidos son una medida directa de los niveles de Ynt1 en la superficie celular. La cepa silvestre en presencia de K^+ mostró unos valores de transporte mucho más altos que en ausencia de este catión. En el caso del mutante $\Delta hak1$ los valores alcanzados en ausencia y en presencia de K^+ fueron menores que en el WT. El mutante $\Delta hak1$ fue incapaz de alcanzar valores de transporte de nitrato en presencia de K^+ similares al WT en las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que en ausencia de K^+ , la cantidad de Ynt1 en la membrana plasmática es mucho menor. Parece que el K^+ es importante para la llegada a la membrana plasmática de Ynt1.

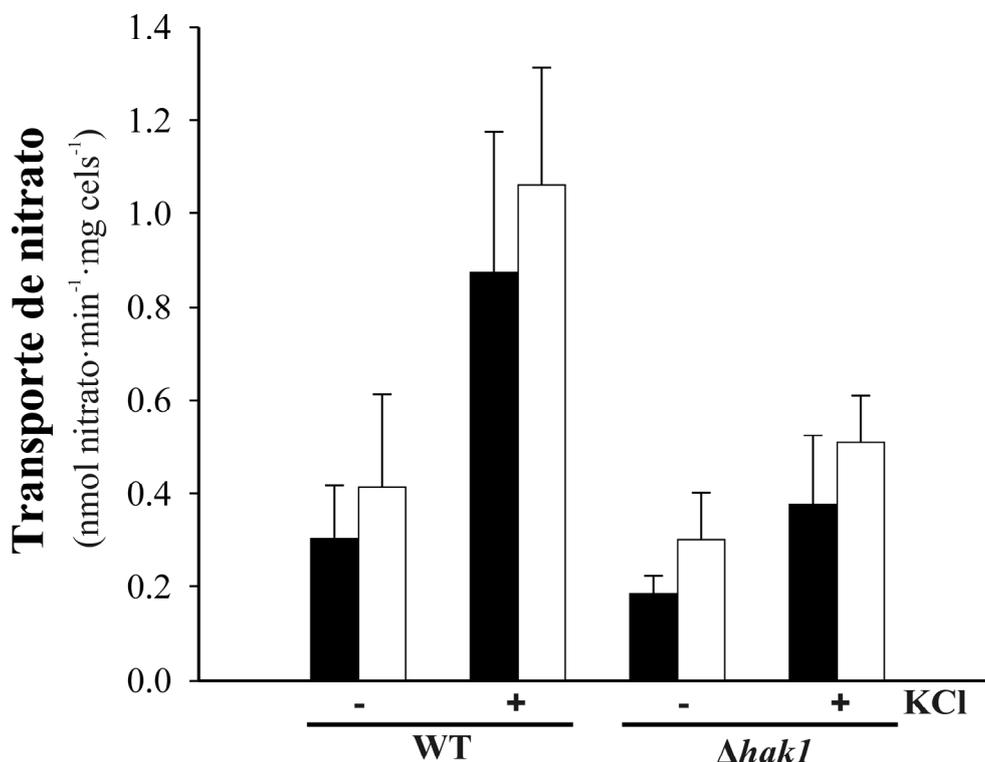


Figura 82. Papel del K^+ en el transporte de nitrato de alta afinidad. Evolución del transporte de nitrato en el WT y en la cepa $\Delta hak1$ con y sin K^+ durante 75 min (barras negras) y 90 min (barras blancas) de incubación en 0,5 mM de nitrato. Las células se crecieron en 5 mM de amonio y se sometieron a ayuno de nitrógeno durante 120 min, antes de adicionar 0,5 mM de nitrato en presencia o en ausencia de 20 mM de KCl.

DISCUSIÓN

En este capítulo caracterizamos los principales sistemas de transporte de K^+ en la levadura *H. polymorpha* centrándonos principalmente en Hak1. Identificamos algunos de los mecanismos de regulación transcripcional y postraducciona que afectan a este transportador.

En *H. polymorpha* el transporte de potasio es llevado a cabo fundamentalmente por dos tipos de transportadores: Trk y Hak. Este hecho es típico de organismos que viven en hábitats donde las concentraciones de K^+ son muy limitantes, como en plantas, en las levaduras *S. occidentalis*, *D. hansenii* y en el hongo *N. crassa* [19, 20, 121, 188, 237, 249]. La coexistencia de ambos tipos de transportadores les supone una ventaja adaptativa a estos ambientes donde las concentraciones de K^+ sufren variaciones muy drásticas. La abundancia de K^+ en los medios en los que crecen habitualmente *S. cerevisiae* y *S. pombe* hace que no necesiten transportadores del tipo HAK, y el transporte de potasio sea dependiente de dos transportadores TRK, Trk1/2 [44, 95, 148, 280].

HAK1 y *TRK1* codifican los principales transportadores de K^+ de *H. polymorpha*. Esta conclusión se obtiene a partir del efecto que tiene la interrupción de estos genes sobre el crecimiento a bajas concentraciones de K^+ , donde se pudo comprobar que el déficit de crecimiento del mutante $\Delta hak1$ fue ligeramente superior al observado en la cepa $\Delta trk1$. El doble mutante $\Delta trk1\Delta hak1$ manifestó siempre un crecimiento más lento en medios bajos en K^+ . Este resultado sugiere la existencia de otro sistema de transporte de K^+ con baja o media afinidad por este catión. Esta hipótesis también se ha barajado para *S. cerevisiae* y *S. pombe*, pues los dobles mutantes carentes de los principales sistemas de transporte de K^+ en estas levaduras (Trk1/2) muestran un comportamiento similar a la cepa $\Delta trk1\Delta hak1$ de *H. polymorpha* [43, 210]. Así se han propuesto varias proteínas para explicar esta actividad transportadora observada en estos dobles mutantes. Uno de estos posibles transportadores de K^+ es la proteína Qdr2. La cepa $\Delta qdr2$ se caracteriza por presentar deficiencias en el transporte de K^+ , las cuales se revierten al sobreexpresar dicho gen. Además la actividad de Qdr2 como transportadora de K^+ es independiente de Trk1/2, ya que el triple mutante $\Delta trk1\Delta trk2\Delta qdr2$ presenta un menor crecimiento en medios con bajo K^+ que la cepa $\Delta trk1\Delta trk2$ [300]. También se le ha atribuido a la ATPasa ACU (“Alkali Cation

Uptake”) un papel en el transporte de K^+ en el hongo *Ustilago maydis* y en la levadura *Pichia sorbitophila* no presente en *S. cerevisiae* [25].

Los transportadores del tipo HAK se definen como transportadores de K^+ de alta afinidad. Para determinar si HpHak1 es un transportador de K^+ de alta afinidad estudiamos sus parámetros cinéticos. Como se desprenden de los valores de K_m , HpHak1 al igual que otros transportadores de esta clase, transporta K^+ con alta afinidad, poniendo de manifiesto que la actividad de Trk1 no es relevante en condiciones de restricción de K^+ . Además la capacidad para transportar K^+ , referenciada a los valores de V_{max} , es mucho mayor para Hak1 que para Trk1. Estos resultados nos indican que Hak1 está mejor adaptado a mediar el transporte de K^+ cuando sus concentraciones son muy bajas, mientras que la actividad transportadora de Trk1 podría ser importante en el control del potencial de membrana en condiciones no limitantes de K^+ , como se ha descrito en *S. occidentalis* [20] y *N. crassa* [121]. El posible papel de Trk1 en el control del potencial de membrana se desprende de la sensibilidad que presentaba la cepa $\Delta trk1$ a cationes tóxicos (Na^+ , Li^+) e higromicina B. En las células, el transporte de potasio junto con la actividad de Pma1, son los principales mecanismos encargados de mantener el gradiente electroquímico [95, 113]. La interrupción de *TRK1* causaba un descenso de los niveles intracelulares de K^+ en las condiciones ensayadas (alta concentración de KCl), con el consiguiente aumento del potencial de membrana, situación en la que la entrada de cationes se ve favorecida. Sin embargo, cuando las concentraciones de K^+ son limitantes, Hak1 también podría participar en el control del potencial de membrana, pues la cepa $\Delta hak1$ era mucho más sensible que $\Delta trk1$ a Na^+ , Li^+ e higromicina B bajo condiciones deficitarias de K^+ .

Por otro lado, observamos como la expresión de *HAK1* es regulada por las concentraciones de K^+ , de forma que se induce en ausencia de K^+ y se reprime en presencia de altas concentraciones de este catión. No obstante, la expresión de *HAK1* en respuesta a la ausencia de K^+ es mediada por la fosfatasa activada por calcio, la calcineurina. Proponemos que la calcineurina es necesaria para la activación de la expresión de *HAK1* en condiciones limitantes de K^+ , porque los mutantes $\Delta cnb1$ y $\Delta crz1$ presentaban defectos en el crecimiento en medios con bajo K^+ y además la cepa $\Delta cnb1$ tenía muy bajos niveles de Hak1. Además la cepa carente del factor transcripcional Gat1, el cual es regulado por la calcineurina [247], mostró bajos niveles de expresión y de proteína Hak1. La adición de Ca^{2+} al medio incrementaba los niveles

de expresión tanto en la cepa silvestre como en el mutante $\Delta gat1$, indicando que *HAK1* no es solamente activado por la calcineurina vía Crz1 y Gat1, sino que existe una activación directa de Crz1 sobre *HAK1*, como ya se ha descrito para *HpENAI* [247]. Por otra parte, sabemos que la delección de *GAT2* incrementa los niveles intracelulares de Ca^{2+} al regular la Ca^{2+} -ATPasa Pmr1, produciendo como consecuencia, un aumento de la activación de la calcineurina [247]. Este hecho explicaba que la expresión y niveles de proteína Hak1 en el mutante $\Delta gat2$ fueran mayores que en una cepa WT, confirmando una vez más el papel de la calcineurina en la regulación de *HAK1*. En *S. cerevisiae* se ha descrito que la calcineurina regula el transporte de K^+ mediado por Trk1, regulando la expresión de Hal5 [50], quinasa que regula la estabilidad de Trk1 en la membrana plasmática [228]. Nosotros mostramos una implicación directa de la calcineurina en la regulación transcripcional de transportadores de K^+ del tipo HAK (Fig. 83).

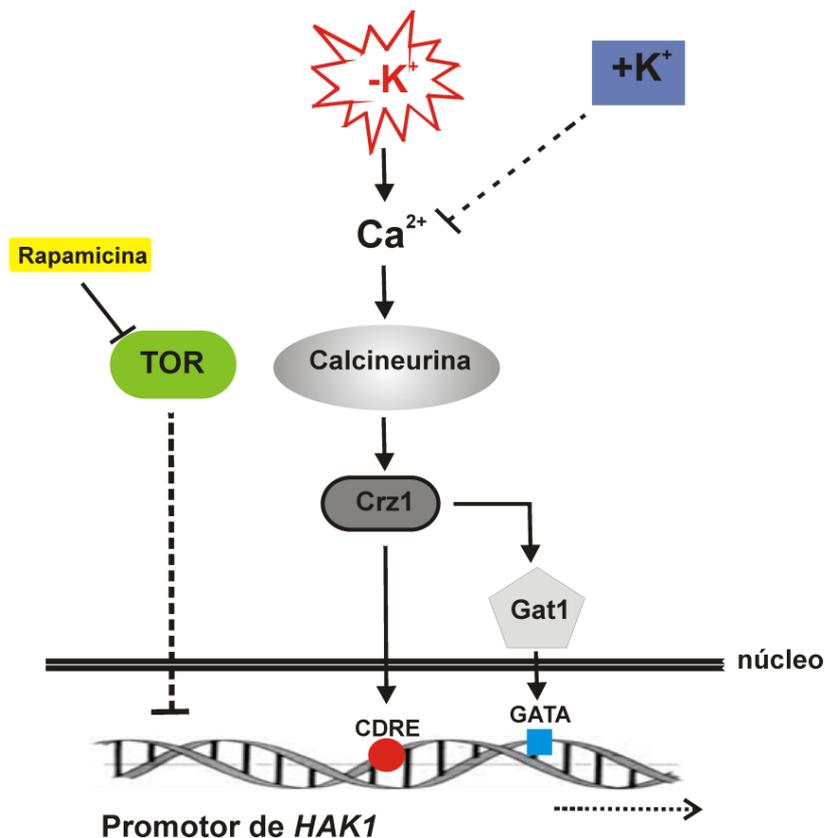


Figura 83. La calcineurina regula la expresión de *HAK1*. Suponemos que el estrés provocado por bajas concentraciones de K^+ , produce un aumento transitorio de Ca^{2+} que activa la calcineurina. Ésta a su vez activa al factor Crz1 que entra al núcleo, se une a las secuencias CDRE en el promotor de *HAK1* y activa su transcripción. También Crz1 activa la expresión de *HAK1* vía Gat1. Suponemos que bajo concentraciones no limitantes de K^+ no se produciría la activación de la calcineurina y consecuentemente, no se induciría la expresión de *HAK1*. La kinasa TOR regula negativamente la expresión de *HAK1*, directa o indirectamente. La posición de TOR en el esquema no es real, desconocemos a qué nivel interacciona en la cascada de activación que presentamos.

A diferencia de *HAK1*, la expresión de *TRK1* no sufre variaciones en ninguna de las condiciones testadas. Esto podría estar relacionado con el papel de Trk1 en el control del potencial de membrana en condiciones no limitantes de K^+ [20].

Los niveles de Hak1 se incrementan en ausencia de K^+ y se reducen en respuesta a altas concentraciones de K^+ . Este hecho hizo que nos planteáramos el estudio de los principales mecanismos de regulación postraduccional que actúan en la modulación de los niveles de Hak1. El uso de mutantes afectados en el tráfico intracelular de proteínas nos permitió concluir que Hak1 es endocitado y degradado en la vacuola en respuesta a K^+ . Procesos similares se han descrito para otras proteínas de membrana como HpYnt1 en presencia de glutamina [212] o ScGap1 en amonio [279]. Observamos además, que la ligasa de ubiquitina Rsp5 es necesaria para la degradación de Hak1 en respuesta a K^+ , pues los niveles de Hak1 permanecían estables en presencia de K^+ en el mutante termosensible *rsp5-1*. Nosotros mostramos que Rsp5 es necesaria para la degradación de Hak1 en presencia de K^+ , sin embargo, Pérez-Valle y colaboradores [228] apuntan que Rsp5 podría ser necesario para la llegada de ScTrk1 a la membrana plasmática. Esto lo deducen tras observar un descenso en los niveles de Trk1 en la cepa $\Delta hal4\Delta hal5$ con una expresión reducida de *RSP5*, en comparación con el doble mutante $\Delta hal4\Delta hal5$.

La mayoría de los sustratos de Rsp5 carecen del motivo de reconocimiento PPXY [305], por lo que resulta muy probable que la actividad de la ubiquitina ligasa dependa de proteínas auxiliares. Hak1 carece de esta secuencia de reconocimiento de Rsp5 así que no descartamos que intervengan proteínas adaptadoras, como en el caso de Gap1, donde su ubiquitinación por Rsp5 depende de las proteínas auxiliares Bul1 y Bul2 [316, 317] o como el caso de Lyp1 (permeasa de lisina), donde su ubiquitinación por Rsp5 depende de las arrestinas Art1 y Art2 [167]. Si bien es cierto que la ubiquitinación de una proteína se produce en sitios específicos (D/E)XK(S/T) [82, 118, 135], Hak1 no posee la secuencia consenso de ubiquitinación pero si posee una putativa secuencia PEST localizadas en el extremo carboxilo citosólico, por lo que es probable que la ubiquitinación ocurra en las lisinas que flanquean esta posible región PEST. Este es el caso de Ynt1, donde la ubiquitinación en respuesta a glutamina ocurre en las Lys253 y Lys270, la cuales flanquean a una secuencia con características de secuencia PEST [212].

Las quinasas Hal4/5 están implicadas en la estabilización de Trk1 en la superficie celular, previniendo su endocitosis y degradación en la vacuola [228]. Nosotros observamos que Npr1 (“Nitrogen Permease Reactivator I”) que pertenece a la misma familia de quinasas que Hal4/5, regula los niveles de Hak1. Esto se concluye porque en ausencia de K^+ los niveles de Hak1 en un mutante $\Delta npr1$ son muchos más bajos que en un WT, y por el contrario, los niveles de Hak1 en una cepa con varias copias de Npr1 (*nNPR1*) son mayores que en el WT. Sugerimos que Npr1 podría estar implicada en el tráfico de Hak1 a la membrana plasmática, de forma que en el mutante $\Delta npr1$, la cantidad de Hak1 en la superficie celular se vería reducida, como se ha demostrado que ocurre en ScGap1 [76] y HpYnt1 [187]. Tampoco descartamos que Npr1 podría estar implicada en la estabilidad celular de Hak1, al igual que lo hacen Hal4/5 con Trk1 [228].

Los mecanismos por los cuales Npr1 regula positivamente la estabilidad de Hak1 en la superficie celular y/o la llegada de este transportador a la membrana los desconocemos. Sabemos por tratamientos con λ -proteína fosfatasa que Hak1 se fosforila y que esta fosforilación podría estar relacionada con la ausencia de K^+ , pues parece que es la banda fosforilada la que primero desaparece en presencia de K^+ . Sin embargo, la fosforilación de Hak1 no parece depender ya sea directa o indirectamente de Npr1. Hak1 se sigue fosforilando en el mutante $\Delta npr1$, aunque en menor medida. Es posible que exista fosforilación dependiente de Npr1 pero no lo vemos con nuestro método de detección de patrones de fosforilación (tratamiento con λ -proteína fosfatasa y SDS-PAGE). La fosforilación de ScGap1 tampoco es estrictamente dependiente de Npr1, porque la combinación de una mutación de la ligasa de ubiquitina Rsp5 con la interrupción de *NPR1* permite recuperar las formas fosforiladas de la permeasa y su desaparición en el mutante podría ser debida a una disminución de la estabilidad de Gap1 [76]. Consistente con esta observación, la fosforilación de Trk1 por Hal5 tampoco se ha observado *in vitro*, la fosforilación de Trk1 aumenta con la sobreexpresión de *HAL5* [228, 319] pero también aumenta la fosforilación de otras proteínas, así como los niveles de proteínas en general. Es por ello que se desconocen los detalles acerca de como Hal5 regula a Trk1 y si la fosforilación de Trk1 es dependiente de esta quinasa.

La identificación de la proteína ribosómica Rpl24a como sustrato *in vitro* de GST-Npr1, permitió identificar la secuencia consenso (K/R)-X-X-S-(K/R) para ScNpr1 [102]. Esta secuencia consenso no la encontramos en Hak1 ni en ScGap1, por ejemplo.

Así, al igual que ocurre con Gap1, es posible que Npr1 regule la estabilidad de Hak1 actuando sobre otras proteínas implicadas en la maquinaria endocítica o de ubiquitinación, porque estos motivos de reconocimiento de Npr1 si se han encontrado en ScBul1 y ScBul2 y en Aly1 y Aly2 [102, 316, 317].

La quinasa Npr1 regula postraduccionalmente numerosas permeasas de aminoácidos y de amonio [76, 215, 219]. Nunca antes había sido relacionada con otros transportadores que no fueran de nitrógeno. En este sentido, observamos que Npr1 incrementa su patrón de fosforilación en ausencia de K^+ . La actividad de Npr1 está regulada en función de las condiciones nutricionales de la célula mediante un mecanismo de fosforilación, de tal manera que en presencia de fuentes preferentes o ayuno de glucosa la proteína se encuentra fosforilada [187]. Este estado fosforilado de Npr1 se correlaciona con los bajos niveles de Ynt1 en presencia de glutamina y ayuno de glucosa. En cambio, en medios sin fuente de nitrógeno o con nitrato la migración de Npr1 es mucho más rápida, y en estas condiciones Ynt1 se encuentra fosforilado, y es mucho más estable [187]. En *S. cerevisiae*, Npr1 parece mostrar una respuesta similar frente a las condiciones del medio correlacionándose su estado de fosforilación con su actividad sobre diferentes permeasas de nitrógeno [267]. En nuestro caso observamos como en presencia de fuentes nitrogenadas preferentes (amonio y glutamina) y en ausencia de K^+ , Npr1 aumenta su patrón de fosforilación. Sin embargo, en presencia de fuentes no preferentes no se producen modificaciones en Npr1, evidenciando que la presencia de fuentes pobres prima sobre la presencia o no de K^+ . Parece que la regulación de Npr1 sobre Hak1 es dependiente de las fuentes nitrogenadas, aunque no se vea reflejado en modificaciones en los patrones de fosforilación de Npr1. No obstante, la cantidad de Hak1 es mayor en medios sin fuente nitrogenada que en glutamina. Esto indica que aunque no podamos relacionar los patrones de fosforilación de Npr1 en función de las fuentes nitrogenadas con la regulación de Hak1, si parece que las fuentes nitrogenadas influyan en Hak1 y por tanto, en Npr1.

La ruta de las quinasas TOR participa en la regulación de Npr1 en *S. cerevisiae* [78, 267]. Esto se deduce del efecto de la rapamicina sobre la fosforilación de Npr1. En presencia de rapamicina, Npr1 se encuentra defosforilado, independientemente de la fuente de nitrógeno presente en el medio [267]. Este hecho se ha relacionado con una posible implicación de TOR en la regulación postraduccional de varias permeasas de aminoácidos [24]. En *H. polymorpha* la rapamicina afecta a la expresión de los genes de Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

la vía de asimilación de nitrato a través de la represión catabólica por nitrógeno [211]. El tratamiento con rapamicina no altera los patrones de fosforilación de Npr1 en presencia de glutamina pero sí en ausencia de glucosa. En este último caso, la rapamicina produce la defosforilación de Npr1 [187]. Cuando comparamos los patrones de fosforilación de células incubadas con rapamicina y con y sin K^+ , observamos un retraso en la movilidad de Npr1 en células incubadas con K^+ y con rapamicina, se observa un patrón similar al que se obtiene al incubar las células sin este catión. En cambio, la rapamicina en medios carentes de K^+ no produce ningún efecto en Npr1 independientemente de la fuente nitrogenada. En presencia de nitrato y en medios sin fuente nitrogenada, no se observa ninguna modificación en la movilidad de Npr1. Estos resultados sugieren que la rapamicina es capaz de simular situaciones de ayuno de K^+ en presencia de fuentes nitrogenadas preferentes, indicando que la ruta de las quinasas TOR parece participar en la regulación de Npr1 en ausencia de K^+ , y también en la regulación negativa de Hak1. Como ya hemos reiterado, *HAK1* se induce a bajas concentraciones de K^+ y se reprime a altas concentraciones. Sin embargo, en presencia de rapamicina y concentraciones altas de K^+ (5 y 10 mM), *HAK1* se expresa solo cuando se le añade rapamicina al medio, confirmando que efectivamente la rapamicina es capaz de simular situaciones de ayuno de K^+ , causando una desrepresión constitutiva de *HAK1* independientemente de la presencia de K^+ en el medio, como ocurre con los genes implicados en RCN [211].

Por último, observamos que la ausencia de K^+ también afecta al transporte de nitrato de alta afinidad, pues en ausencia de K^+ el transporte de nitrato de alta afinidad es menor que en presencia de este catión. Se sabe que las quinasas Hal4/5 participan en regular la estabilidad en la superficie celular tanto del transportador Trk1 como de otro tipo de transportadores (Can1, Fur4, Hxt1 y Gap1) en condiciones limitantes de K^+ [228]. En nuestro caso parece que tanto el K^+ como la presencia de Hak1 son necesarios para el correcto desarrollo de la actividad transportadora de Ynt1, actividad que para que Ynt1 la realice necesita estar en la superficie celular. El transporte de nitrato ocurre como un cotransporte $NO_3^-:2H^+$ y esto da lugar a una alcalinización del medio [193, 194]. Para mantener el gradiente electroquímico es necesaria la actividad de una H^+ -ATPasa. No obstante, que el transporte de K^+ sea necesario para contrarrestar la entrada de cargas negativas (NO_3^-) y por eso no hay transporte de nitrato no es suficiente para explicar el descenso en el transporte de nitrato de alta afinidad que observamos en el WT y en el mutante $\Delta hak1$. Aunque desconocemos la magnitud que tiene el transporte

de K^+ y Hak1 en el transporte de nitrato, suponemos que va más allá de mantener el gradiente electroquímico, quizás el K^+ sea necesario para estabilizar Ynt1 en la superficie celular.

En conclusión, Hak1 y Trk1 constituyen los principales sistemas de transporte de K^+ en *H. polymorpha*. Además mostramos por primera vez algunos de los mecanismos implicados en la regulación transcripcional y postraduccional de un transportador de K^+ del tipo HAK. En este sentido, los niveles de Hak1 están regulados por diferentes mecanismos como la calcineurina y Gat1 a nivel transcripcional; y postraduccionalmente, por Npr1, la ubiquitinación, endocitosis y degradación en la vacuola (Fig. 84).

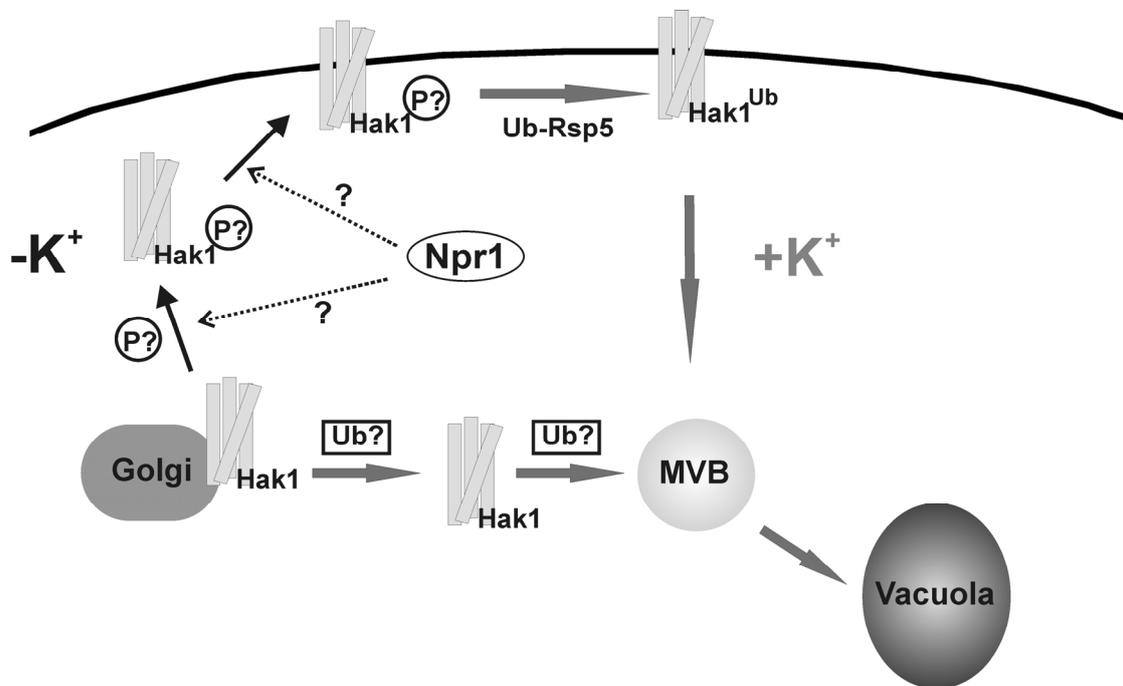


Figura 84. Modelo de regulación postraduccional de Hak1 en función de las concentraciones de K^+ . En condiciones deficitarias de K^+ , Hak1 se localiza en la superficie celular. Desconocemos si la fosforilación de Hak1 es necesaria para su llegada y/o estabilidad en la membrana plasmática. La adición de K^+ provoca la ubiquitinación dependiente de Rsp5 de Hak1, su endocitosis y envío a la vacuola para su degradación. Suponemos que existe una ruta alternativa de envío a la vacuola sin pasar por la membrana. Npr1 podría regular positivamente a Hak1, bien permitiendo su llegada a la superficie celular y/o estabilizando a Hak1 en la membrana plasmática. Desconocemos si Npr1 podría fosforilar ya sea directa o indirectamente a Hak1 y esto estar relacionado con su llegada y/o estabilidad en la superficie celular.

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc03611/zbc7298-11z ZSUBMIT 10 xppws 5=1 23/6/11 5:52 4/Color Figure(s) F1,2 ARTNO: M111.265116

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. ??, PP. 1–xxx, 7777 ??, 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^{*[5]}

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

Yusé Martín¹, Yelvis V. González², Elisa Cabrera³, Celia Rodríguez³, and José M. Siverio⁴

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.

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

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

* 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.

[5] 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.

¹ 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.

² Recipient of a predoctoral fellowship from CajaCanarias-Universidad de La Laguna.

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

⁴ 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 μM 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 TOR⁵ 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 Ca²⁺ and Mn²⁺ 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, 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⁻ura3⁻*. 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 K⁺ experiments, cells were grown in synthetic 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 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.⁶ 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-

⁵ The abbreviation used is: TOR, target of rapamycin.

⁶ 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 μ 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 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 PMSF) 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.

λ -Protein Phosphatase Treatment—50 μ g of proteins was incubated with 150 units of λ -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

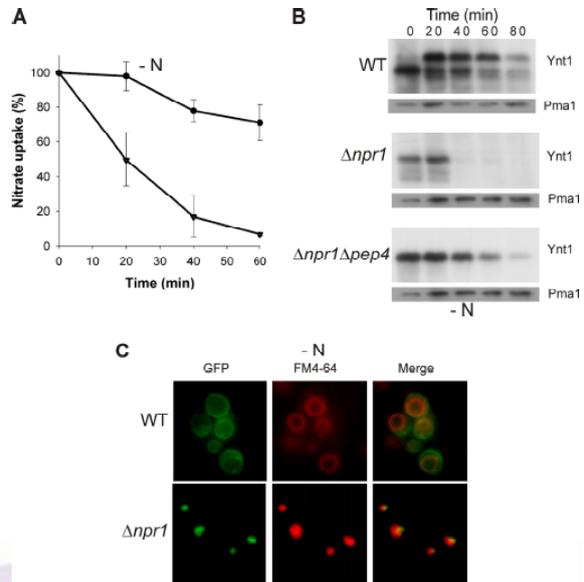


FIGURE 1. Npr1 is essential to maintain Ynt1 levels under nitrogen limitation conditions. A, nitrate uptake by WT (●) and $\Delta npr1$ (▼) strains transferred to nitrogen-free medium. Values are expressed as a percentage of nitrate transport rate (100% = 0.803 ± 0.03 nmol of nitrate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) 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

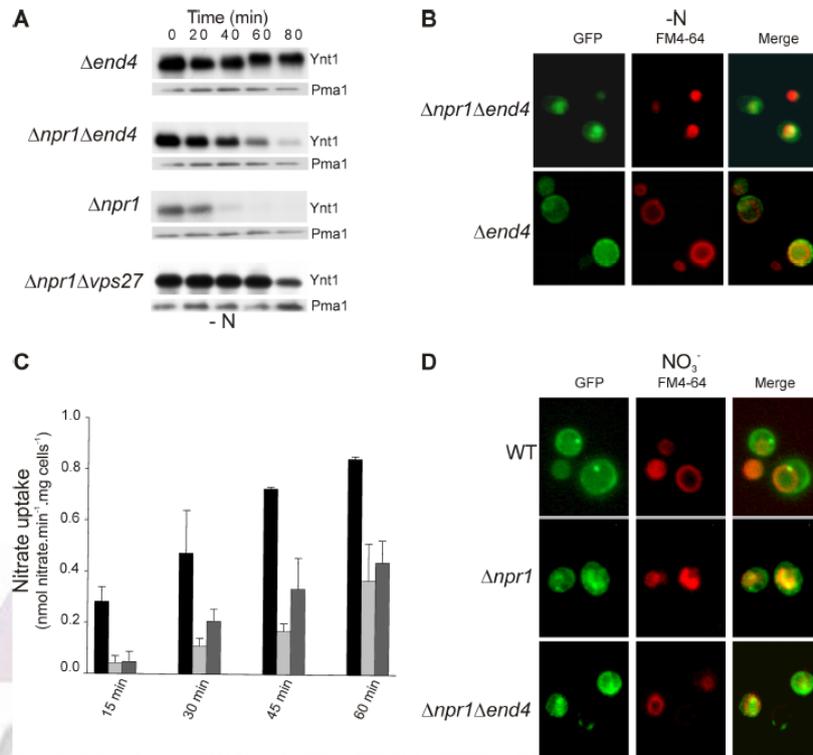


FIGURE 2. **NPR1** disruption causes sorting of Ynt1 to the vacuole. **A**, levels of Ynt1 in different mutant strains subjected to nitrogen deprivation. Cells were incubated in 10 mM nitrate for 2 h and deprived of nitrogen for 80 min. **B**, cellular distribution of Ynt1-GFP before and after 40 min 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^{2S→A} 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 $\Delta npr1$ 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 $\Delta npr1$, not detected in $\Delta npr1\Delta ynr1$ (Fig. 3B). λ -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-

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc03611/zbc7298-11z ZSUBMIT 10 xppws S=1 23/6/11 5:52 4/Color Figure(s) F1,2 ARTNO: M111.265116

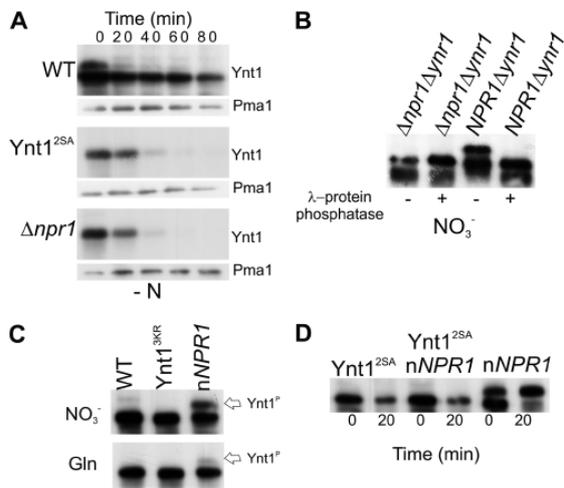


FIGURE 3. Phosphorylation of Ynt1 is mediated by Npr1. A, immunoblots of Ynt1 from nitrogen-depleted cells. Previously, cells were incubated in 10 mM nitrate. B, Ynt1 mobility in SDS-PAGE of protein extracts treated (+) or nontreated (-) with λ -protein phosphatase. The indicated strains were incubated in 5 mM nitrate for 2 h. C, phosphorylation state of Ynt1 in WT, Ynt1^{3K→R} 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^{3K→R} 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^{3K→R} 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^{2S→A} or in nNPR1Ynt1^{2S→A} 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^{2S→E} strains under nitrogen limitation conditions, indicating that NPR1 deletion acts beyond Ynt1 phosphorylation (Fig. 4A). Despite this, in a WT genetic background, Ynt1^{2S→E} reversed Ynt1^{2S→A} in such a way that Ynt1^{2S→E} levels were almost unaltered under nitrogen limitation, unlike Ynt1^{2S→A} (12). In $\Delta npr1$, Ynt1 degradation was nevertheless counteracted when the Lys residues involved in

Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

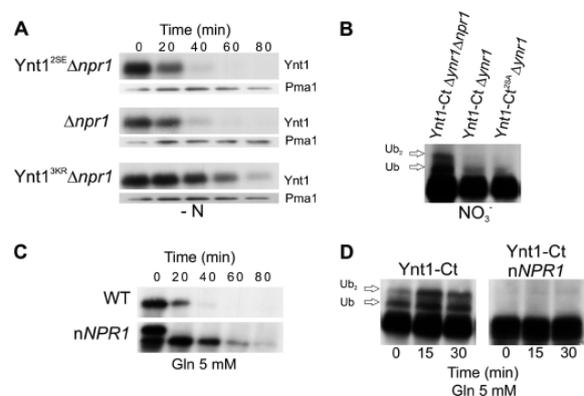


FIGURE 4. Npr1 is involved in regulating Ynt1 ubiquitinylation. A, effect of NPR1 disruption on the levels of Ynt1^{2S→E} and Ynt1^{3K→R} under nitrogen-free conditions. Cells incubated in 10 mM nitrate for 2 h were then deprived of nitrogen. B, Ynt1 ubiquitin (Ub) conjugates increase in $\Delta npr1$. 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 forms of Ynt1 in a $\Delta npr1$ mutant were determined by the use of $\Delta npr1\Delta ynr1$ bearing the Ynt1 ^{Δ 232–286}-Ct236–286 (Ynt1-Ct) mutation, achieved by fusing the core sequence (236–286) of the central cytosolic domain to the C terminus of Ynt1 ^{Δ 232–286} (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^{2S→A}) 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

ZSI

Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

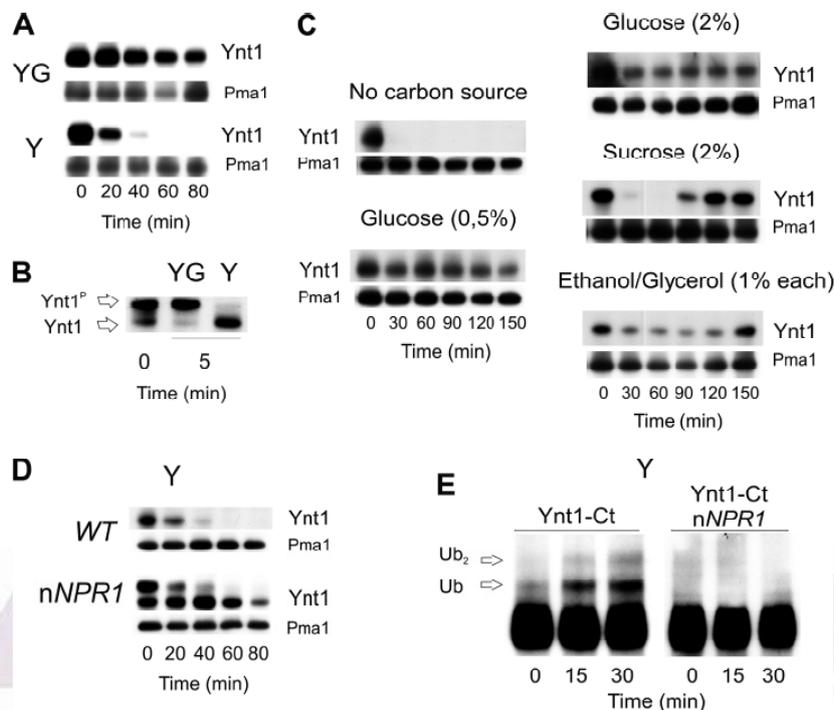


FIGURE 5. Ynt1 is down-regulated by carbon starvation, and this is counteracted by Npr1 overexpression. A, Ynt1 is down-regulated after carbon withdrawal. Cells were incubated in YNB, 2% glucose, and 5 mM nitrate for 2 h and then transferred to the same medium without nitrogen, with 2% glucose (YG) and 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 Hak1⁷ increase their stability in response to preferred nitrogen sources or K⁺ 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_i transporter Pho84 are unaffected in response to iron or P_i 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.⁸ 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 ubiquitinylated 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 Δ *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 Δ *cnb1* and WT (supplemental Fig. S3).

Npr1 Phosphorylation State Is Regulated by Nitrogen Source Quality, Carbon Source, and K⁺ 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

⁷ Y. Martín and E. Cabrera, unpublished results.

⁸ M. D. Pérez and Y. V. González, unpublished results.

Npr1 Protein Kinase Regulates *Ynt1* Levels

E6

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. λ -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 μ 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 μ 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

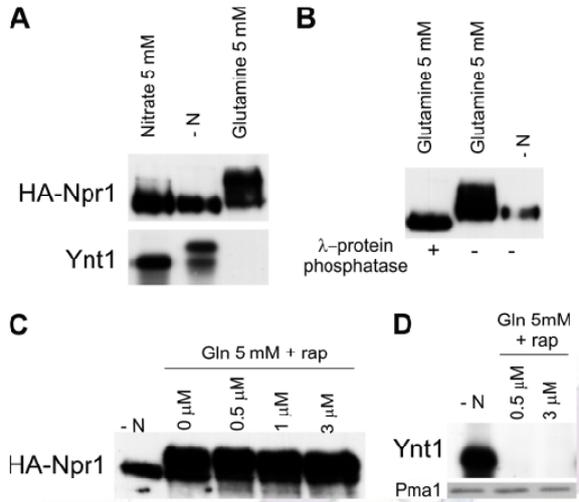


FIGURE 6. Nitrogen-dependent phosphorylation of *Npr1*. A, HA-*Npr1* (upper panel) and *Ynt1* (lower panel) mobility in SDS-PAGE using anti-HA and anti-*Ynt1*. Cells were incubated in 5 mM nitrate for 1.5 h and then transferred to a nitrogen-free medium or 5 mM glutamine for 1 h. B, HA-*Npr1* SDS-PAGE 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 λ -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 μ M rapamycin, for 40 min. *Pma1* was used as loading control.

E7

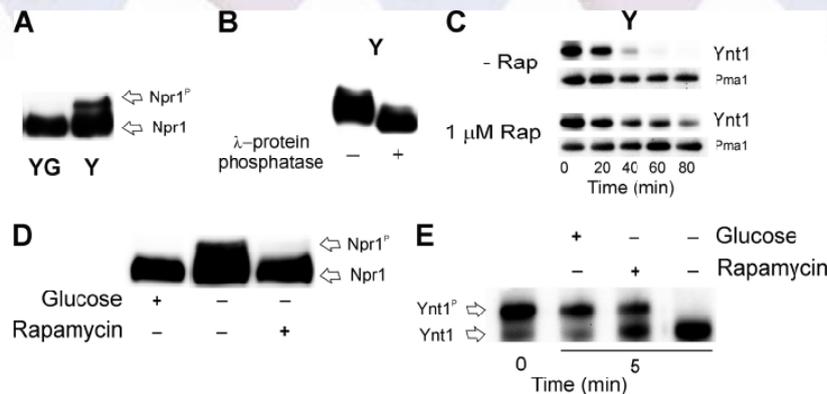


FIGURE 7. Carbon-dependent *Npr1* and *Ynt1* regulation is rapamycin-sensitive. A, HA-*Npr1* SDS-PAGE mobility in carbon-starved cells. Cells were incubated in 5 mM nitrate for 1 h and then transferred to the same medium without nitrogen with 2% glucose (YG) or without (Y). B, HA-*Npr1* SDS-PAGE mobility in extracts from carbon-starved cells treated with λ -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 μ 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 μ 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 μ 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⁺ but only in preferred nitrogen

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⁺ 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⁺. Indeed, addition of 20 mM KCl restored nitrate transport. We concluded that the absence of K⁺ 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.

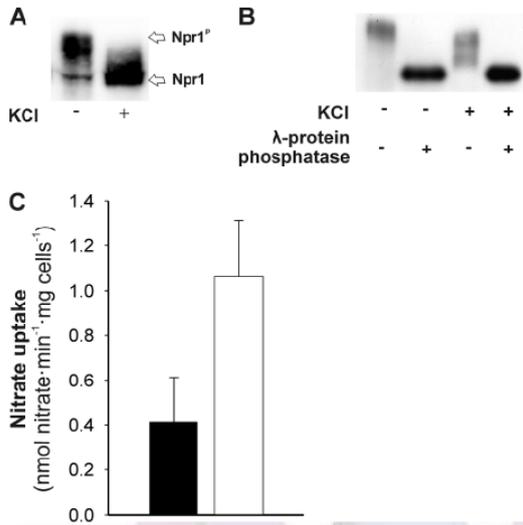


FIGURE 8. Potassium deprivation induces phosphorylation of Npr1. A, HA-Npr1 SDS-PAGE mobility. WT cells expressing HA-Npr1 were incubated in ammonium with 20 mM KCl or without for 2 h. B, Npr1 SDS-PAGE mobility changes are due to phosphorylation. Cell extracts were treated with λ-protein phosphatase (+) 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.

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

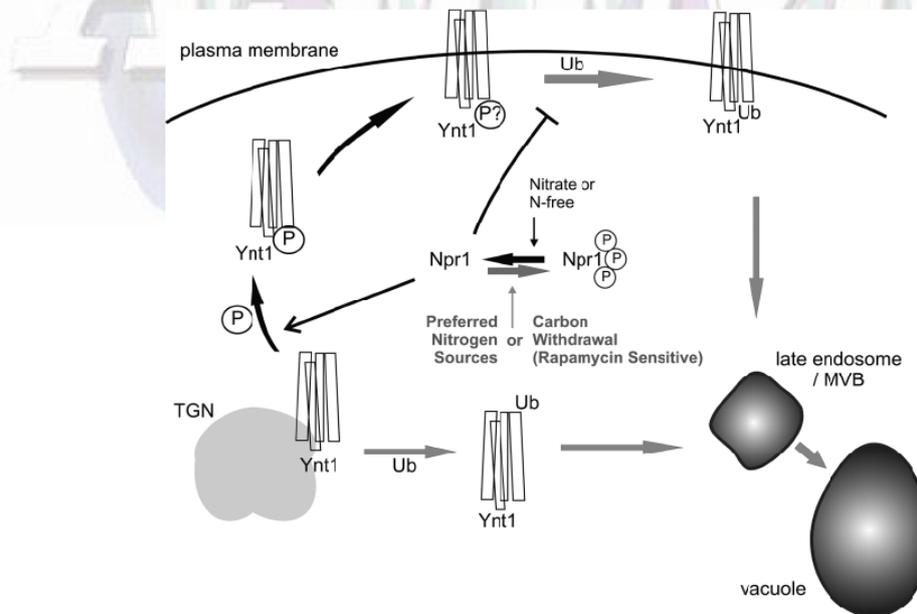


FIGURE 9. Npr1 is involved in sorting and stabilizing Ynt1 at the plasma membrane. In preferred nitrogen sources or carbon starvation, Npr1 is polyphosphorylated, although Ynt1 is not phosphorylated, being therefore sorted via late endosome/multivesicular body (MVB) to the vacuole from the trans-Golgi network (TGN) (gray arrows). Under these conditions, Ynt1 located at the cell surface is ubiquitinylated (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).

Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

$\Delta npr1$ presents a high sensitivity to toxic cations such as Li^+ or hygromycin B.⁷

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^{2S→A} 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^{3K→R} (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, ⁵¹KGSSR⁵⁵, ³¹⁹KVKSK³²³, and ⁸⁴⁹KQHKS⁸⁵³, and Bul2, ⁴⁴⁶KRTSK⁴⁵⁰) (45). Moreover, *in vitro* and *in vivo* findings strongly suggest that the phosphorylation state and activity of the α -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^{2S→E} (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^{3K→R} 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

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^{2S→E} was degraded in a $\Delta npr1$ mutant (Fig. 4A), unlike the WT strain, and the nonphosphorylatable form of Ynt1^{2S→A} 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 K⁺ transporter Hak1 degradation⁶ 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 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ and hygromycin sensitivity.⁸ 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
- Llamas, A., Igeño, 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. Mi-*

crobiol. 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, H., 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
- Kaouass, 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, J. (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., Géraud, G., and Haguenaer-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
- Gänder, S., Bonenfant, D., Altermatt, P., Martin, D. E., Hauri, 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, H., 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.,

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc03611/zbc7298-11z	ZSUBMIT 10	xppws S=1	23/6/11	5:52	4/Color Figure(s) F1,2	ARTNO: M111.265116
--	------------	-----------	---------	------	------------------------	--------------------

Npr1 Protein Kinase Regulates Ynt1 Levels

- Urban-Grimal, D., and Haguenaucr-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. Rodríguez, 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., Mocs, S., Polcetto, 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, E. J., and Kaiser, C. A. (2003) *J. Cell Biol.* **161**, 333–347



3. Modificaciones en la entrada neta de nitrato a través de Ynt1 regulan la vía de asimilación de nitrato.

*La vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha* se regula a nivel de la nitrito reductasa. Existe una relación inversa entre la cantidad de transporte de nitrato a través de Ynt1 con los niveles de expresión de YNII, de forma que a más nitrato consumido menores son los niveles de NiR y mayor es la cantidad de nitrito excretado. Esta regulación negativa sobre YNII es llevada a cabo por la acumulación de fuentes nitrogenadas preferentes y aunque parezca una falta de rendimiento en la reducción de nitrato, puede tener un significado ecológico, pues le permitiría competir con otros organismos más sensibles al nitrito que *H. polymorpha*. A su vez, la excreción de nitrito permite mantener los niveles intracelulares del mismo por debajo de concentraciones letales para las células.*

3.1. Los niveles de Yni1 y no de Ynr1 varían en función de las cepas ensayadas.

El transportador de nitrato de alta afinidad (Ynt1) de la levadura *H. polymorpha* ha sido objeto de numerosos estudios. Ynt1 está sometido tanto a una regulación transcripcional como postraduccional en respuesta a fuentes nitrogenadas. Ynt1 es degradado en respuesta a glutamina, previa ubiquitinación de los residuos de lisina 253 y 270 localizados en la región central hidrofílica de Ynt1 [212]. Por otro lado, la fosforilación de los residuos de serina 244 y 246 regulan la estabilidad de Ynt1 y controlan el tráfico intracelular del transportador dirigiéndolo a la membrana plasmática [213]. Estos resultados nos condujeron a plantearnos el papel de estas modificaciones postraduccionales en la regulación integral de la vía de asimilación de nitrato, ya que dichas modificaciones alteran la entrada de nitrato a través de Ynt1. Es por ello, que nos centramos en el estudio de la NR y NiR, implicadas en la reducción del nitrato hasta amonio.

Mientras que la regulación de la nitrato reductasa en *H. polymorpha* ocurre principalmente a nivel transcripcional, siendo el nitrato el principal inductor de su expresión y las fuentes nitrogenadas preferentes (como el amonio o la glutamina) las que reprimen su expresión [211], muy poco se conoce acerca de la regulación de la nitrito reductasa. La determinación de la actividad nitrito reductasa en dicha levadura presenta numerosos problemas, detectándose nula o escasa actividad en una cepa silvestre. No obstante, siempre nos hemos preguntado si las determinaciones de la actividad nitrito reductasa han estado negativamente influenciadas por la composición

de los tampones de extracción y ensayo. Así, en una primera fase del trabajo revisamos los medios de extracción y ensayo para la determinación de dicha actividad. Sin embargo, después de incluir varias modificaciones en los tampones de extracción y de ensayo, no fuimos capaces de mejorar la determinación de la actividad nitrito reductasa en esta levadura.

Resultados preliminares obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio indicaban que los niveles de proteína nitrito reductasa incrementaban en cepas carentes de *YNRI* e *YNTI*, sugiriendo que la actividad NiR aumentaba cuando el flujo de la vía de asimilación de nitrato disminuía (Germán Perdomo, datos sin publicar).

Por todo ello estudiamos los niveles de Ynt1 en diversos mutantes afectados en el transporte neto de nitrato. Estos mutantes carecían de la nitrato reductasa, de Ynt1, de la quinasa Npr1 o presentaban deleciones o mutaciones puntuales en el dominio central hidrofílico de Ynt1. Otras de las cepas usadas fue $\Delta ynt1TbNRT2$ que corresponde a una cepa de *H. polymorpha* en la cual se le ha sustituido *YNTI*, por el transportador de nitrato *NRT2* de la trufa *T. borchii* [205]. El mutante $\Delta npr1$ carece de la quinasa de proteínas Npr1 implicada en la fosforilación directa o indirecta de Ynt1. Esta cepa presenta deficiencias en el envío de Ynt1 a la superficie celular, de forma que la cantidad de Ynt1 en la membrana plasmática es menor y como consecuencia, el transporte de nitrato también es menor [187, 212, 213]. Las cepas Ynt1 ^{$\Delta 232-286$} , Ynt1^{3S→A} e Ynt1^{3K→R} derivan de diferentes mutaciones dentro de la región central hidrofílica de Ynt1. En concreto, como se muestra en la figura 85, Ynt1 ^{$\Delta 232-286$} carece de la región comprendida entre los residuos 232 y 286; Ynt1^{3S→A} tiene sustituidos los residuos S244A, S246A, S252A por alaninas, que impiden la fosforilación dentro de este dominio citosólico de Ynt1. Esta cepa se caracteriza por presentar una menor cantidad de Ynt1 en la superficie celular, pues la fosforilación de Ynt1 es necesaria para su correcto envío a la membrana plasmática [212]. Por último se utilizó la cepa Ynt1^{3K→R} que tiene sustituidas las lisinas K243R, K253R y K270R por argininas. Esta cepa ha sido utilizada para caracterizar los procesos de endocitosis y ubiquitinación de Ynt1 [212]. El transportador sigue siendo funcional y se acumula en la membrana plasmática porque no puede ser endocitado.

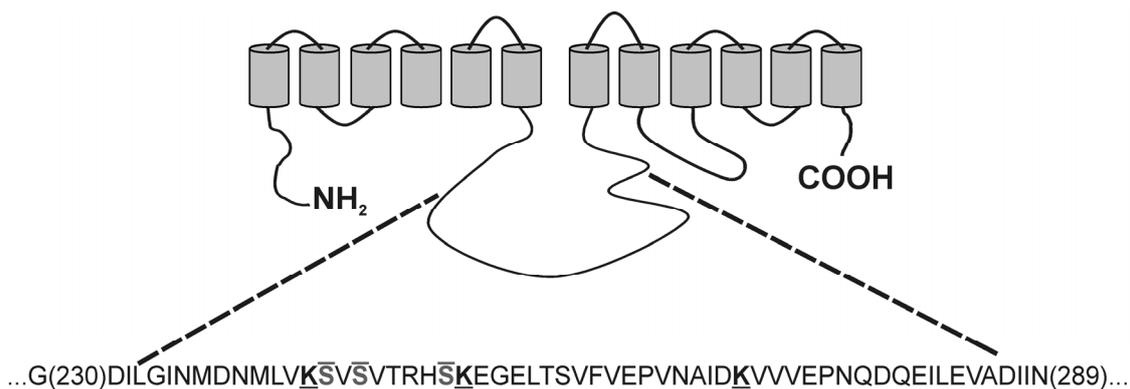


Figura 85. Representación esquemática de Ynt1 y parte de la secuencia del dominio central citosólico. En sombreado se indica la secuencia eliminada en Ynt1^{Δ232-286}. En negrita se señalan los residuos de lisina K243, K253 y K270 sustituidos por arginina en la cepa Ynt1^{3K→R}. Los residuos de serina S244A, S246A y S252A sustituidos por alaninas en la cepa Ynt1^{3S→A} se muestran de color gris y sobrrayados.

Si atendemos al inmunoblot (Fig. 86) se observa que existen marcadas diferencias en cuanto a los niveles de Yni1 y no de Ynr1 en las distintas cepas analizadas. Todas las cepas que presentan alteraciones en el transportador de nitrato ($\Delta ynt1/TbNRT2$, $\Delta ynt1$, Ynt1^{Δ232-286}, Ynt1^{3S→A} y $\Delta npr1$) a excepción de Ynt1^{3K→R} presentan una mayor cantidad de Yni1, con respecto a la cepa silvestre. La cepa Ynt1^{3K→R} presenta bajos niveles de Yni1 igual que la cepa WT, pues estas modificaciones lo único que provocan es que Ynt1 no pueda ser ubiquitinado y se acumule en la membrana.

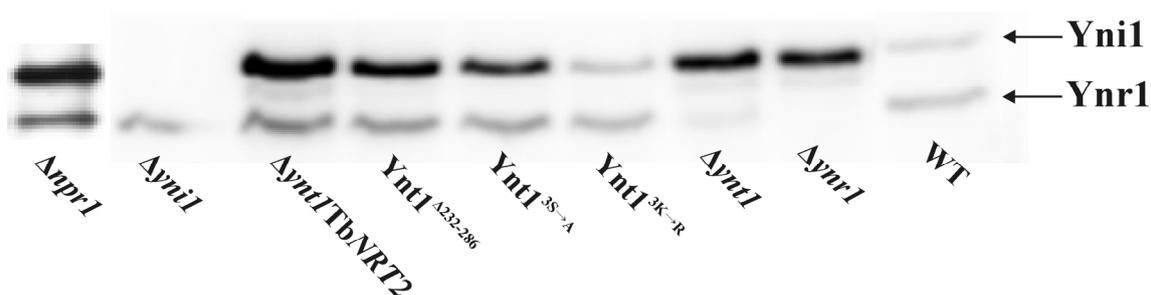


Figura 86. Niveles de Yni1 e Ynr1 en las distintas cepas. Las células fueron crecidas en 5 mM de amonio y transferidas a 5 mM de nitrato durante 120 min. Se cargaron unos 20 μ g de proteínas por pocillo para realizar el inmunoblot.

3.2. Los niveles de Yni1 varían en función de la cantidad de Ynt1.

La búsqueda de más pruebas que corroboraran la idea de la posible incidencia del transporte de nitrato sobre la regulación de *YNI1*, nos llevó a usar cepas con promotores delecionados del gen *YNT1*, en concreto contenían 145 pb de la región 5' no

codificante del gen *YNT1*, y se caracterizaban por presentar una menor cantidad de Ynt1, menor transporte de nitrato y reducida cantidad de nitrito excretado que una cepa WT (Francisco Navarro, datos no mostrados). Es la cepa LE, de la cual se usaron dos clones, LE1 y LE2. En ambos clones se observaban mayores niveles de Yni1 que en el WT (Fig. 87). Estos resultados presentaban una buena correlación negativa entre la cantidad de transportador (Ynt1) en la membrana con el consumo de nitrato, y por tanto, con la cantidad de nitrito reductasa. De esta forma suponemos que estas cepas al tener menor cantidad de Ynt1, el transporte de nitrato es menor y por tanto, la cantidad de fuentes nitrogenadas reducidas disminuyen, lo que provoca un aumento en los niveles de Yni1.

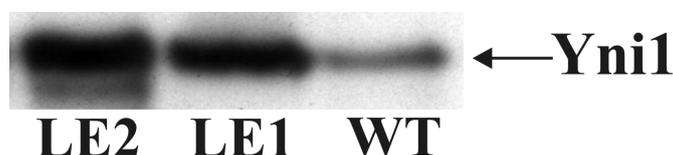


Figura 87. Las cepas LE1 y LE2 presentan mayores niveles de Yni1 que la cepa WT. Células crecidas en 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml, fueron transferidas a 5 mM de nitrato durante 120 min. Para realizar el inmunoblot se aplicaron 20 µg de proteína por pocillo y se usaron anticuerpos anti-Yni1.

Una vez observado que la reducción de los niveles de Ynt1 producía un aumento en la cantidad de Yni1, nos preguntamos qué efecto tendría sobre la NiR todo lo contrario, es decir, el aumentar la cantidad de Ynt1. Para ello transformamos una cepa WT (portadora de una copia de *YNT1*) con el plásmido integrativo *pTYNT0*, portador de una copia funcional de *YNT1*. Se seleccionaron aquellos transformantes que presentaban un incremento en la cantidad de nitrito excretado, resultado de un mayor transporte de nitrato, producido como consecuencia de un aumento de la cantidad de Ynt1 en la membrana. De esta forma se seleccionaron 5 transformantes (*nYNT1*), identificados con un número del 1 al 5.

En la figura 88A se observa como a diferencia de los niveles de Ynr1 que no sufrían variación, los niveles de Yni1 eran menores en todos los clones de *nYNT1* analizados con respecto al WT, ya que al menos tenían dos copias funcionales de *YNT1*. Aquellos como *nYNT1-4* y *nYNT1-5* debían tener más de dos copias de *YNT1*, pues la cantidad de proteína nitrito reductasa era todavía menor que en el resto de los clones *nYNT1s*.

Estos bajos valores de Yni1 observados en las cepas *nYNT1*, se lograron revertir interrumpiendo el gen de la nitrato reductasa en uno de estos clones (*nYNT1* clon 1) (Fig. 88B). Con esta modificación conseguimos que el nitrato que es transportado al interior no pueda ser reducido a nitrito y ésta a amonio, con lo que al no estar presentes no pueden ejercer su efecto negativo sobre la nitrito reductasa.

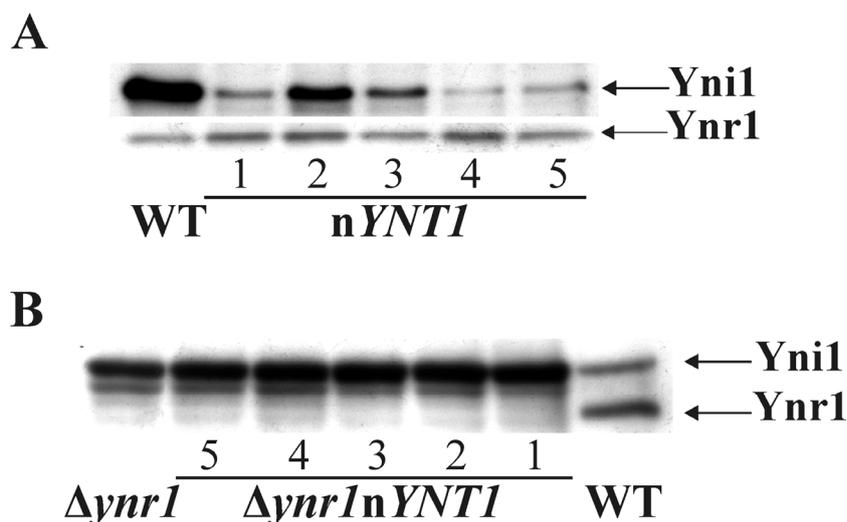


Figura 88. Niveles de Yni1 en cepas con diferente número de copias de *YNT1*. Los distintos transformantes analizados (representados con un número del 1-5) se crecieron en amonio hasta 10 mg/ml y se transfirieron a 10 mM de nitrato durante 120 min. Se aplicaron 20 μ g de proteína por pocillo. **A.** Se representan los transformantes *nYNT1*s. **B.** Además de tener varias copias de *YNT1*, tienen interrumpido el gen *YNR1*.

Estos resultados nos indican que existe una correlación negativa entre la cantidad de Ynr1 y los niveles de Yni1.

3.3. Las variaciones en los niveles de Yni1 se corresponden con variaciones en la expresión de *YNI1*.

Los resultados hasta ahora mostrados se basan en la determinación de la proteína Yni1, sin embargo, nos preguntamos si los cambios observados en los niveles de nitrito reductasa se reflejaban en variaciones de la expresión del gen *YNI1*. Por ello, decidimos abordar el estudio de los niveles de expresión de esta enzima en distintas cepas portadoras de la construcción *YNI1-lacZ*. Todas las cepas analizadas que se caracterizan por presentar niveles más altos de Yni1 que la cepa WT, también presentan mayores valores de expresión que la cepa silvestre, de casi el doble de actividad β -galactosidasa (Fig. 89). Las variaciones en los niveles de Yni1 se corresponden con los

valores de expresión del gen *YNI1* entre las distintas cepas ensayadas. Según estos resultados, la correlación negativa entre *Ynt1* y los niveles de NiR, se establece a nivel transcripcional.

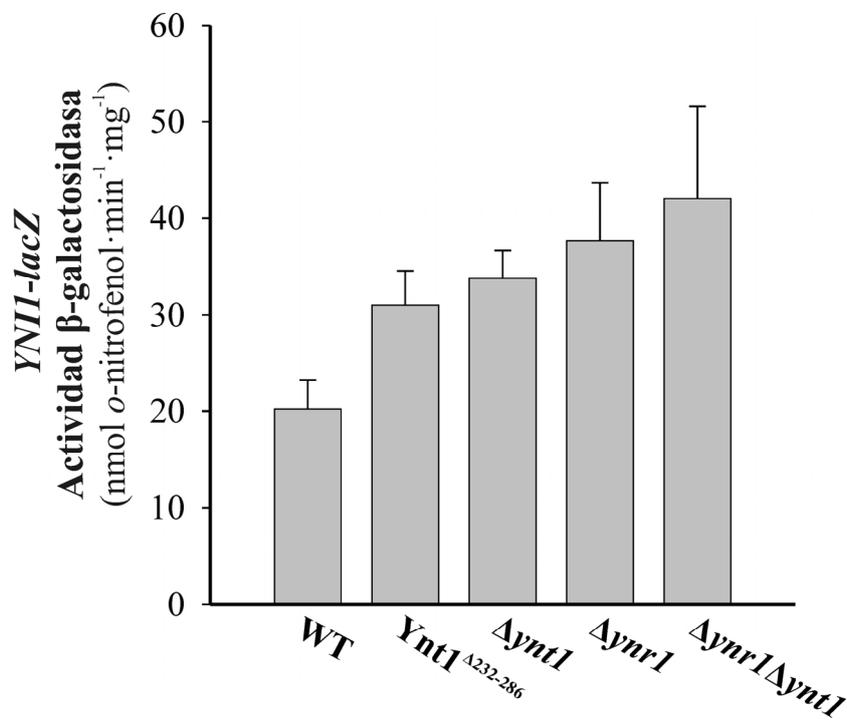


Figura 89. Cepas con bajo consumo de nitrato presentan mayor expresión de *YNI1*. Las células fueron crecidas en 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml y transferidas a 5 mM de nitrato durante 120 min. Se muestran los valores medios de tres experimentos independientes \pm la D.E.

3.4. Variaciones en el consumo de nitrato modifican los niveles de *Yni1*.

Llegados a este punto, los resultados indicaban que las variaciones en los niveles de *Yni1* observados, iban acompañados de modificaciones en la cantidad de nitrato incorporado al interior celular vía *Ynt1*. Por ello medimos el consumo de nitrato en las distintas cepas analizadas, para comprobar si efectivamente existía una correlación negativa entre la cantidad de nitrato consumido y los niveles de *Yni1*. Los datos obtenidos (Tabla 7) muestran que aquellas cepas con bajos niveles de *Yni1* presentan un mayor consumo de nitrato y, como consecuencia, suponemos que una mayor acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas, además de un aumento en la excreción de nitrito, como ocurre con la cepa *nYNT1*. Las cepas con mayores niveles de *Yni1*, como $\Delta ynr1$, $\Delta ynt1$, *Ynt1* ^{$\Delta 232-286$} , $\Delta ynt1/TbNRT2$ e *Ynt1*^{ST→A}, son aquellas que

presentan un reducido consumo de nitrato y por tanto, una menor producción de fuentes nitrogenadas reducidas y una menor excreción de nitrito (Fig. 90).

CEPAS	$\mu\text{M NO}_3^-$ medio	$\mu\text{M NO}_2^-$ excretado	$\mu\text{M NO}_3^-$ asimilado	% NO_3^- asimilado	Niveles de Yni1
nYNT1	996	51	953	150	--
WT	1329	35	636	100	-
Ynt1 ^{3K→R}	1350	50	600	94	-
Ynt1 ^{Δ232-286}	1491	34	475	75	+
Ynt1 ^{3S→A}	1500	0	500	79	+
Δynt1TbNRT2	1598	0	402	63	+
Δynt1	1836	0	162	25	++
Δynr1	1916	0	84	13	+
LE-1	1401	1	598	94	+

Tabla 7. Variaciones en el consumo de nitrato. Las células crecidas en 5 mM de amonio se transfirieron a 2 mM de nitrato durante 120 min. Entiéndase los μM de nitrato asimilado como $\mu\text{M NO}_3^-$ iniciales – ($\mu\text{M NO}_3^-$ en el medio + $\mu\text{M NO}_2^-$ excretado).

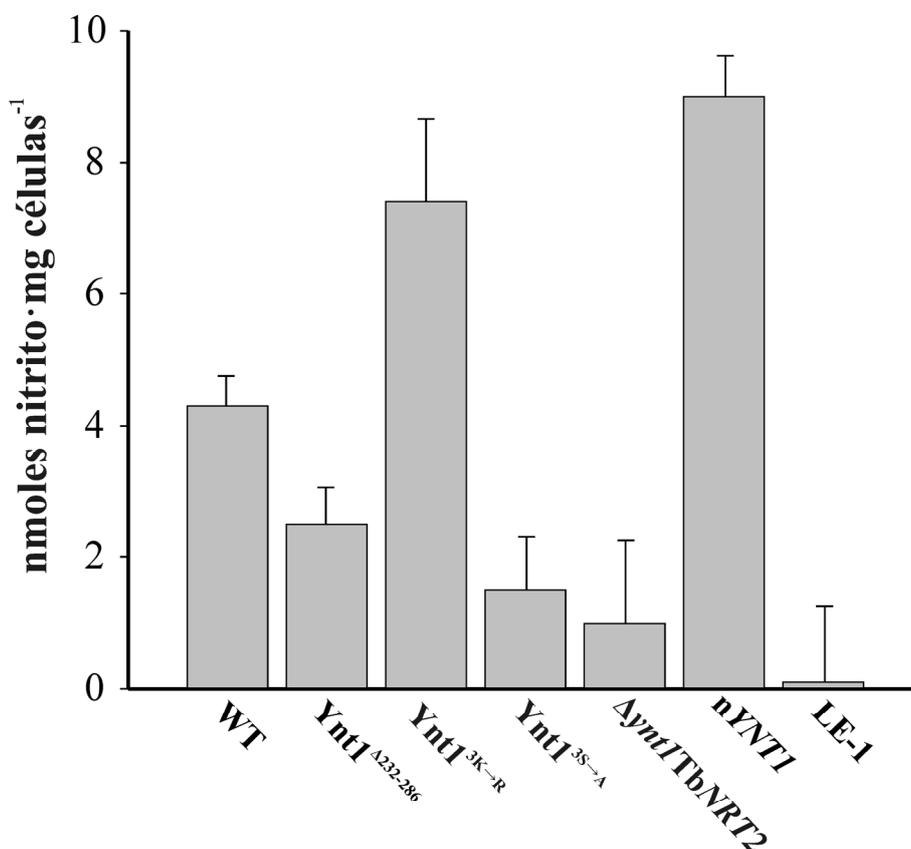


Figura 90. Excreción de nitrito tras 120 min en presencia de nitrato. Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se transfirieron a 2 mM de nitrato para determinar la excreción de nitrito tras 120 min.

3.5. La acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas reprimen la expresión de *YNII*.

A la vista de todos los resultados anteriores podemos pensar que el efecto represor sobre la *Yni1* se deba: i) a la acumulación intracelular de nitrito; ii) al pool de fuentes nitrogenadas reducidas fruto de la asimilación de nitrato; o iii) a una combinación de ambos elementos. Para determinar cuál de estos fenómenos eran los responsables de regular negativamente la *NiR*, estudiamos la expresión de *YNII* en un mutante de la nitrito reductasa (portador de la construcción *YNII-lacZ*). El mutante $\Delta yni1$ se caracteriza por la producción únicamente de nitrito en presencia de nitrato, con lo cual si fuera el nitrito el causante de reprimir el gen *YNII* se vería reflejado en unos bajos niveles de expresión de *YNII* con respecto al WT.

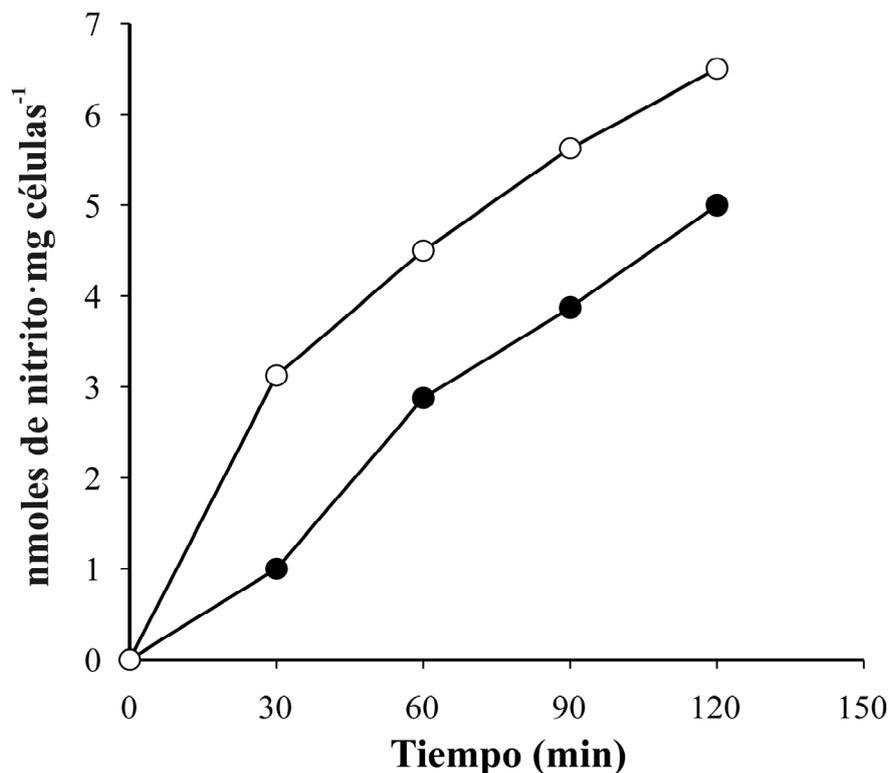


Figura 91. La cepa $\Delta yni1$ se caracteriza por unos altos valores de excreción de nitrito. Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se transfirieron a 5 mM de nitrato para determinar la excreción de nitrito en las cepas WT (●) e $\Delta yni1$ (○). Los ensayos fueron repetidos tres veces sin variaciones significativas.

Los valores de actividad β -galactosidasa (Fig. 92) reflejaban que el nitrito no era el causante de reprimir el gen *YNII*, pues la cepa $\Delta yni1$ a pesar de presentar mayores niveles de excreción de nitrito (Fig. 91), tenía valores de expresión de *YNII* de

aproximadamente el doble con respecto al WT, en cualquiera de los medios empleados. Además la expresión de *YNI1* incrementaba al aumentar la concentración de nitrato en el medio tanto en el WT como en el mutante $\Delta yni1$. Sin embargo, este incremento de expresión era mayor en el mutante $\Delta yni1$, sugiriéndonos que posiblemente era la acumulación de fuentes preferentes las causantes de reprimir este gen y de tener bajos niveles de Yni1. Los valores de expresión son mucho mayores en la cepa $\Delta yni1$ que en el WT, porque en presencia de nitrato no se produce amonio, como si ocurre en el WT.

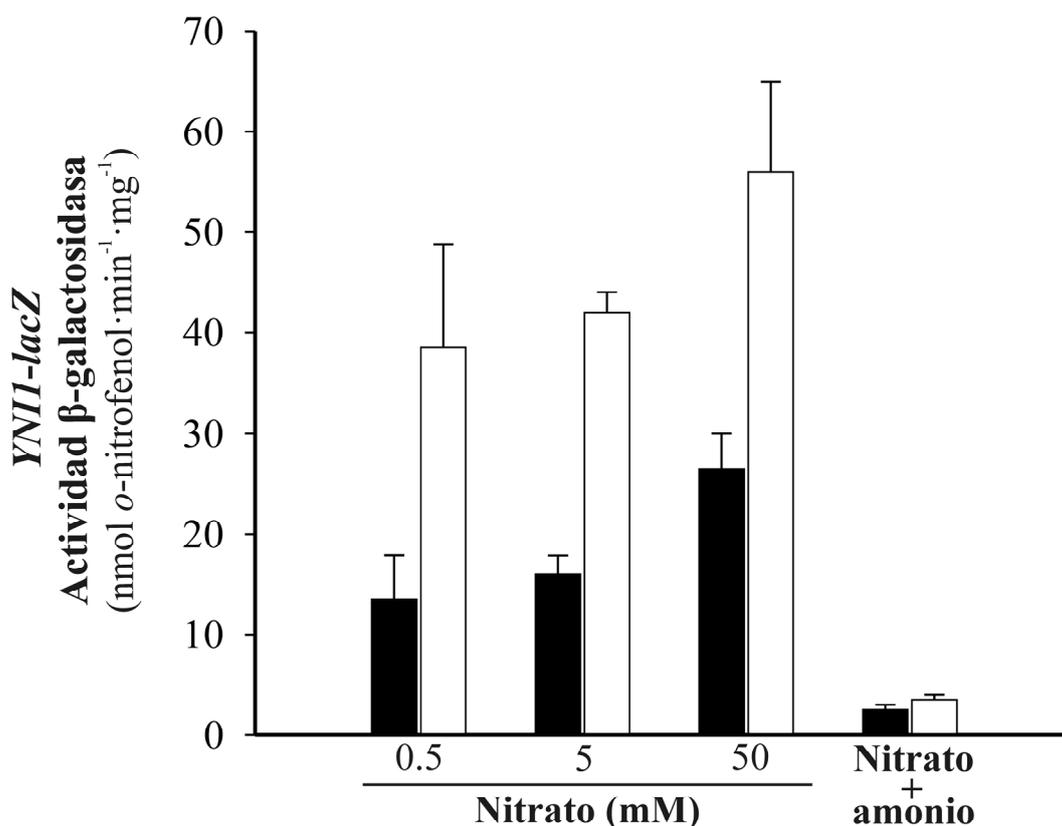


Figura 92. El amonio reprime la expresión de *YNI1*. Las células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se transfirieron a medios con 0.5, 5 y 50 mM de nitrato y a un medio con 50 mM de nitrato más 10 mM de amonio durante 120 min. Tras este tiempo se determinó la actividad β -galactosidasa en las cepas WT (barras negras) e $\Delta yni1$ (barras blancas) portadoras de la construcción *YNI1-lacZ*. Se muestran los datos correspondientes a tres experimentos independientes \pm la D.E.

Para validar esta hipótesis incubamos estas mismas cepas pero en presencia de nitrato más amonio (Fig. 92). Ante esta combinación, la expresión de *YNI1* disminuye drásticamente tanto en el WT como en el mutante $\Delta yni1$. Así pues, parece que es la presencia de fuentes nitrogenadas preferentes las causantes de reprimir la expresión de *YNI1*, provocando la excreción al medio extracelular de un producto altamente tóxico como es el nitrito.

DISCUSIÓN

En este capítulo presentamos evidencias experimentales acerca de como la vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha* se regula a nivel de la nitrito reductasa.

La nitrito reductasa cataliza la reducción del nitrito a amonio. En base a su donador de electrones se distinguen dos tipos de NiR asimiladoras [116]: NiR dependientes de Fd (ferredoxina), presente en plantas superiores y algas, y NiR dependiente de NAD(P)H, en hongos y bacterias [132, 311]. Ambas enzimas poseen un grupo prostético Fe₄S₄ y otro sirohemo, formado por un átomo de hierro, cuatro anillos pirrólicos y ocho grupos carboxílicos. Las NiRs dependientes de NAD(P)H contienen además un grupo FAD [46].

La regulación de la nitrito reductasa ocurre principalmente a nivel transcripcional, como se ha descrito en *C. utilis* [269, 270, 271], *C. reinhardtii* [98], *H. polymorpha* [33], y *N. crassa* [85]. Para la nitrito reductasa de *C. utilis* se ha descrito además una regulación postraducciona mediada por fuentes nitrogenadas reducidas. La nitrito reductasa de *C. utilis* es un heterodímero de 58 y 66 kDa que bajo condiciones de inducción y represión mantiene dos estados de autofosforilación diferentes. El estado activo de la enzima, en presencia de nitrato, estaría asociado a una autofosforilación de la subunidad de 66 kDa y desfosforilación de la subunidad de 58 kDa; mientras que el estado inactivo de la enzima, en presencia de amonio, estaría asociado a una desfosforilación de la subunidad de 66 kDa y autofosforilación de la subunidad de 58 kDa [269, 270, 271].

En plantas además de la regulación transcripcional, se ha descrito una regulación postraducciona para las nitrito reductasas de *Nicotiana plumbaginifolia* y *A. thaliana* mediada por las fuentes nitrogenadas reducidas. La expresión constitutiva de NiR reveló que aunque en presencia de amonio se detectó ARNm nitrito reductasa, la proteína y actividad se vieron fuertemente reducidas [72].

Sin embargo, en *H. polymorpha* muy poco se sabe de la regulación de la nitrito reductasa. En este caso, la nitrito reductasa es un homodímero de 116 kDa que presenta gran similitud con las nitrito reductasa de *A. nidulans* y *Klebsiella pneumoniae* [33]. Parece que la regulación de Yni1 se produce fundamentalmente a nivel transcripcional, donde el nitrato se comporta como inductor y el amonio como represor. La proteína

Yni1 es bastante estable en presencia de fuentes nitrogenadas reducidas [226]. Durante este trabajo se analizó si Yni1 sufría cambios de movilidad electroforética que pusieran de manifiesto cambios en el estado de fosforilación de la enzima. Reiterados intentos de encontrar dichos cambios, no arrojaron modificaciones sustanciales en la movilidad electroforética de la proteína.

En este trabajo hemos encontrado que la expresión de HpYNI1, a diferencia de YNRI, es muy sensible a la cantidad de nitrato asimilado. La expresión de YNI1 presenta una correlación negativa con la cantidad de nitrato transportado al interior celular, de manera que a más nitrato consumido, menores son los niveles de Yni1. De esta forma, cepas con menor cantidad de Ynt1 en la superficie celular, y como consecuencia menor transporte de nitrato, como las cepas $\Delta npr1$, $\Delta ynr1$, LE, Ynt1^{3S→A} e Ynt1^{Δ232-286} presentaban mayores niveles de Yni1. Por el contrario, los niveles de Yni1 disminuían en las cepas que sobreexpresaban YNTI (nYNTI), que se caracterizaban por presentar un incremento en la cantidad de nitrato consumido. Sin embargo, cuando interrumpimos en estas cepas la vía de asimilación de nitrato a nivel de la NR conseguimos que los niveles de Yni1 se incrementen, llegando a superar los niveles del WT. Estos resultados nos indican que bien la acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas o la producción de nitrito, podrían ser las responsables de regular los niveles de Yni1. Por eso creímos necesario descartar que la regulación negativa del flujo de nitrato sobre la nitrito reductasa era consecuencia de la producción de nitrito. El estudio de la expresión del gen YNI1 en el mutante $\Delta yni1$ reveló que no es el nitrito el causante de tal represión, pues aun con altos niveles de excreción de nitrito, la expresión de YNI1 era mayor en la cepa $\Delta yni1$ que en el WT. El hecho de que el nitrito no inhiba la NiR también se ha observado en *C. reinhardtii* [171] y en *Arabidopsis* [172] donde el nitrito si inhibe la NR y los transportadores de nitrato. Algo similar ocurre en *H. polymorpha* donde, aparte de que el nitrito no inhiba la NiR, si inhibe la entrada de nitrato a través de Ynt1 [177]. Los resultados que se obtuvieron al analizar la expresión del gen YNI1 bajo concentraciones crecientes de nitrato sugerían que posiblemente era la acumulación de fuentes preferentes las causantes de reprimir el gen YNI1. No solo porque la expresión de YNI1 incrementaba al aumentar la concentración de nitrato en el medio, sino porque además, este incremento era mayor en el mutante $\Delta yni1$ que en el WT, ya que la cepa $\Delta yni1$ no produce amonio en presencia de nitrato, como si ocurre en el WT. Cuando además de nitrato se añadía amonio al medio, la expresión del gen YNI1 era

prácticamente nula, tanto en el WT como en $\Delta yni1$, indicando que es el amonio u otras fuentes preferentes las que reprimen la expresión de *YNI1*. Esto no quiere decir que el amonio reprima solamente la expresión de este gen, sino que pequeñas cantidades de amonio producidas tras la reducción del nitrato son suficientes para reprimir la expresión del gen *YNI1* y no la del gen *YNRI*, pues los niveles de NR permanecen relativamente constantes. Puede que el promotor de *YNI1* sea más sensible a amonio que el de *YNRI*, aunque tras comparar sus secuencias, no se observaron variaciones significativas. No obstante, puede que la estabilidad del ARNm de la NiR sea menor que el de la NR y sea más sensible a las fuentes nitrogenadas preferentes. Puede que existan diferencias en la región 5'UTR de la NiR que hagan que el ARNm sea más inestable. Se sabe que la estabilidad del ARNm se ve afectada por la longitud de la región 5'-UTRs del ARNm, así como por la estructura secundaria de estas regiones no transcritas [48].

El hecho de que el flujo de nitrato a través de Ynt1 regule la vía de asimilación de nitrato a nivel de la NiR, aunque parezca una falta de rendimiento en la reducción de nitrato, puede tener un significado ecológico, ya que permite la excreción de un producto altamente tóxico [129, 130, 131]. Esto le podría permitir competir con otros organismos más sensibles al nitrito que *H. polymorpha*. A su vez, la excreción de nitrito permite mantener los niveles intracelulares del mismo por debajo de concentraciones letales para las células. Además indica la existencia de sistemas de excreción de nitrito. Nuestro grupo de investigación ya ha identificado la existencia de una proteína implicada en la excreción de este intermediario (Rafaela González, GMN, Tesis Doctoral).

Por otro lado, la excreción de nitrito también puede suponer una forma de evitar la acumulación de amonio. En levaduras, el amonio resulta tóxico para las células bajo condiciones limitantes de K^+ , puesto que bajo estas condiciones se produce una entrada masiva de NH_4^+ a través de los transportadores de K^+ . El efecto tóxico del amonio además ocurre en presencia de altas concentraciones de K^+ si existe una expresión constitutiva de los transportadores de amonio. A diferencia de las plantas, *S cerevisiae* para reducir la toxicidad del NH_4^+ excreta grandes cantidades de aminoácidos [126]. En plantas, concentraciones de amonio entre 0.1-0.5 mmol/L resultan especialmente tóxicas, produciendo clorosis e inhibición generalizada del crecimiento [174, 303]. Aunque no se conoce muy bien porque el amonio resulta tóxico para las

plantas, si se sabe que durante el transporte de amonio se produce una acidificación del medio, consecuencia de que el transporte de NH_4^+ va acoplado a una salida de H^+ [35]. Esta salida de H^+ produce modificaciones del pH intracelular. Además se producen variaciones en los niveles de hormonas y de algunos cationes esenciales como K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} [35, 174]. Las plantas para reducir los efectos tóxicos del mismo excretan amonio, sin embargo, la excreción de NH_4^+ requiere un alto gasto energético para la célula [35, 155].

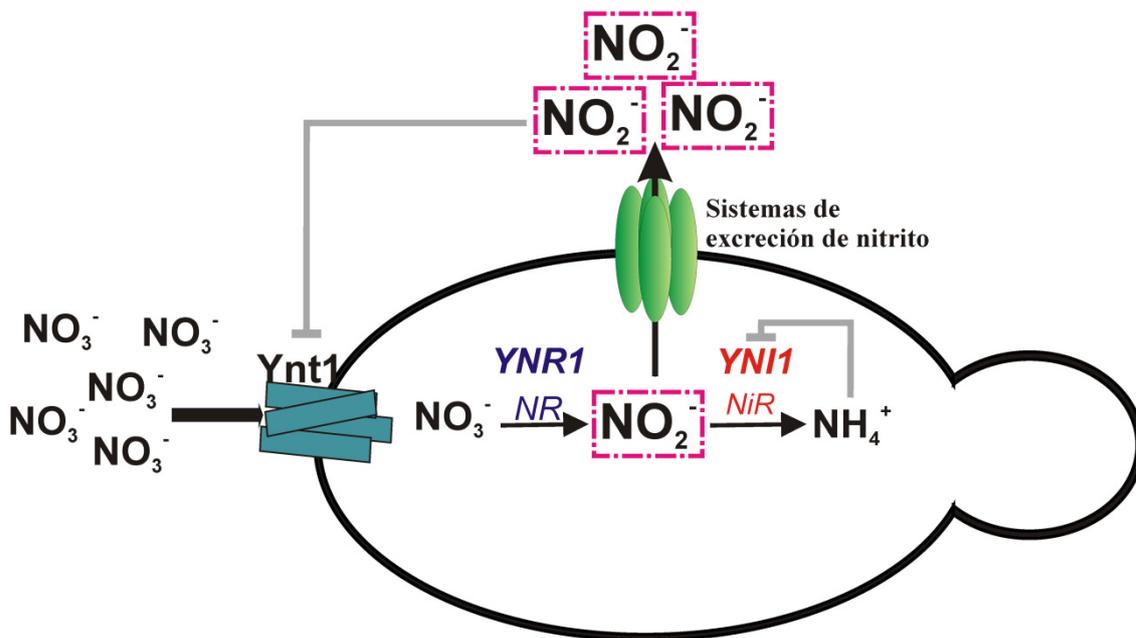


Figura 93. Las fuentes nitrogenadas reducidas fruto de la asimilación del nitrato regulan negativamente la nitrito reductasa en *H. polymorpha*. El nitrato entra al interior celular principalmente por Ynt1, y es transformado a nitrito por acción de la nitrato reductasa (NR). Este nitrito es reducido hasta amonio por la nitrito reductasa (NiR) y es incorporado a los esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos. La acumulación de fuentes nitrogenadas reducidas produce una regulación negativa sobre el gen que codifica para la nitrito reductasa (YNI1), lo que produce una acumulación transitoria de nitrito que es rápidamente excretado al exterior celular.

En conjunto estos resultados indican que la reducción del nitrito es un paso limitante y que puede formar parte de un mecanismo para coordinar el transporte de nitrato al interior celular y su asimilación, recordemos que las células transportan más nitrato del que pueden asimilar, además de evitar el efecto tóxico que tendría el nitrito y el amonio (Fig. 93). Los sistemas de excreción de nitrato que han sido descritos anteriormente también formarían parte de estos mecanismos de regulación de la vía de asimilación de nitrato.

IV. PERSPECTIVAS

IV. PERSPECTIVAS.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha permitido avanzar en el conocimiento de la vía de asimilación de nitrato. Nuestro grupo ha considerado la importancia de los sistemas de excreción de nitrato/nitrito en la asimilación de nitrato. En esta tesis se inicia la caracterización de las entidades moleculares implicadas en dichos procesos de excreción de nitrato y nitrito. La caracterización del primer sistema de excreción de nitrato en hongos será una referencia para la identificación de otros sistemas de excreción en otros organismos asimiladores de nitrato e incluso en *H. polymorpha*. Nuestros resultados sugieren la existencia de otras proteínas implicadas tanto en la excreción de nitrato como de nitrito, así que sería muy interesante estudiar si existe algún tipo de regulación entre Ssu2 y estos nuevos sistemas de excreción y cuál es la afinidad por el nitrato y el nitrito de estas proteínas. Asimismo, en los transportadores de nitrato de alta afinidad se han descrito dos residuos Arg-87 y Arg-368, localizados en las regiones transmembranales, importantes para transportar nitrato con alta afinidad [297]. Ssu2 presenta un residuo de Arg en la posición 85, también en la segunda región transmembrana, pero en la posición 368 encontramos Leu en lugar de Arg, al igual que ScSsu1. Es por ello, que mediante mutagénesis dirigida de estos residuos se podría determinar el papel de HpSsu2 y de ScSsu1 tanto en lo que se refiere a su función como permeasa de sulfito como de nitrato.

Tanto en plantas como en algunos hongos asimiladores de nitrato se ha determinado la capacidad de la nitrato reductasa de producir óxido nítrico y la importancia que tiene la flavohemoglobina en la detoxificación frente al NO producido. Por esto, sería de gran utilidad para continuar profundizando en los mecanismos de regulación de la vía de asimilación de nitrato, aislar el gen que codifica la flavohemoglobina en *H. polymorpha*. Podríamos estudiar bajo qué condiciones se expresa este gen y si al igual que ocurre en plantas y otras levaduras es el responsable de la detoxificación del óxido nítrico y si la producción del NO es dependiente de la presencia de la nitrato reductasa. Otros de los puntos a estudiar sería su participación directa o indirectamente en el estrés oxidativo, pues en *S. cerevisiae*, Yhb1 se induce bajo la presencia de compuestos generadores de ROS (Cassanova *et al.*, 2005).

Los ensayos de competencia nitrito-sulfito (datos no mostrados) revelaron que posiblemente el nitrito y el sulfito sean transportados al interior celular a través del

mismo sistema de transporte, pues el mutante $\Delta ssu2$, muy sensible a sulfito, es capaz de crecer cuando en el medio además de sulfito hay nitrito. Este hecho podría ser utilizado para caracterizar los sistemas de transporte de nitrito en *H. polymorpha*, aún sin identificar. Se podría aislar mutantes capaces de crecer en concentraciones altas de sulfito. Presumiblemente estos mutantes muestren incapacidad para transportar nitrito y su aislamiento constituiría una excelente aproximación para la identificación de nuevos transportadores de nitrito.

En lo referente al transporte de potasio, sería muy interesante identificar que otras proteínas de membrana son capaces de transportar K^+ (recordemos que el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ sigue creciendo en medios con bajas concentraciones de este catión). El descubrimiento de la implicación de Npr1 en el control del transporte de potasio en *H. polymorpha* pone en evidencia algunas importantes cuestiones que deberían ser resueltas. Por un lado, cual es el mecanismo postraducciona l a través del cual esta quinasa ejerce su acción sobre la entrada de potasio vía Hak1. No sabemos si Npr1 actúa controlando la localización celular de este transportador. Pensamos que esta quinasa es necesaria para la correcta llegada de Hak1 a la superficie celular, sin embargo falta confirmarlo. La localización de Hak1 en el mutante $\Delta npr1$ así como el uso de varios mutantes afectados en el tráfico intracelular nos ayudará a contestar esta pregunta. Otra incógnita que se deriva de estos resultados es como Npr1 regula a Hak1, pues ya comprobamos como la fosforilación de Hak1 es independiente de Npr1. Puede que la función de Npr1 estribe en bloquear la ubiquitinación de Hak1, impidiendo la unión a proteínas adaptadoras, como las proteínas Bul o las arrestinas. Así el estudio de Hak1-HA en los respectivos mutantes para estas proteínas sería una buena aproximación. Además la identificación de los sitios potenciales de ubiquitinación y fosforilación nos ayudaría a avanzar, así como identificar a la posible quinasa encargada de la fosforilación directa o indirecta de Hak1. HpHal4 sería una buena candidata. Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta sería el mecanismo que desencadena los cambios en la fosforilación de esta quinasa en respuesta a las modificaciones del medio. Los datos apuntarían hacia la ruta de las quinasa TOR. Resultaría muy interesante identificar los principales elementos de esta vía de señalización, principalmente en lo referente a la única quinasa TOR que codifica el genoma de *H. polymorpha*. Otras proteínas importantes en la transmisión de este tipo de señales como Sit4 o necesarias para la actividad de los complejos TORC como Lst8 merecerían también ser

consideradas. No obstante, la fosfatasa calcineurina también podría ser importante a la hora de regular los patrones de fosforilación de Npr1. Podríamos empezar estudiando los patrones de fosforilación de Npr1 en el mutante $\Delta cnb1$, y comprobar si existen modificaciones. Asimismo, también sería interesante estudiar si Npr1 regula al otro transportador de potasio identificado en nuestra levadura modelo, Trk1. Puede que Npr1 también participe controlando la localización celular de este transportador, o bien, su presencia sea requerida para que Trk1 sea capaz de transportar potasio. Cualquier futura estrategia deberá basarse en el análisis del estado y ubicación de la proteína. Para ello es clave el etiquetar este transportador con algún epítipo que nos permita realizar estudios inmunológicos o fusionar la proteína a GFP para seguir su localización *in vivo*.

También sería oportuno confirmar que el K^+ es importante para la llegada a la membrana de Ynt1. Para ello estudiaríamos la localización celular de Ynt1-GFP en el WT y en el mutante $\Delta hak1$ en presencia y en ausencia de K^+ . También podríamos analizar si la ausencia de K^+ provoca el envío directo de Ynt1 desde la ruta de secreción a la vacuola, empleando varios de los mutantes afectados en el tráfico intracelular que disponemos en el laboratorio.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES.

1. Ssu2 es una proteína de membrana que transporta nitrato hacia el exterior celular en *H. polymorpha*. Ssu2 se induce por nitrito y es importante para mantener la viabilidad celular en nitrato.
2. El escaso transporte neto de nitrato en los mutantes carentes de la nitrato reductasa es debido a la presencia de sistemas de excreción de nitrato. La nitrato reductasa no es esencial para el transporte de nitrato.
3. La expresión del gen *SSUI* de *S. cerevisiae* en *H. polymorpha* mostró su capacidad para excretar nitrato y nitrito.
4. Trk1 y Hak1 constituyen los dos principales sistemas de transporte de K^+ en *H. polymorpha*. Hak1 es un transportador de alta afinidad. La interrupción de *TRK1* afecta a la sensibilidad de la levadura a cationes tóxicos.
5. La expresión de *HAK1* y no la de *TRK1* es regulada por K^+ . La inducción de *HAK1* en respuesta a la ausencia de K^+ está mediada por la calcineurina, vía Crz1 y Gat1, y directamente a través de Crz1.
6. Hak1 es endocitado y degradado en la vacuola en respuesta a K^+ . Este proceso es dependiente de la ligasa de ubiquitina Rsp5. La quinasa de proteínas Npr1 es un regulador positivo de los niveles Hak1.
7. Los niveles de nitrito reductasa presentan una correlación inversa con los valores del flujo de nitrato a través de Ynt1. Las fuentes nitrogenadas reducidas fruto de la asimilación del nitrato regulan negativamente la expresión de *YNII*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI. MATERIALES Y METODOS.

1. Microorganismos, medios de cultivo, condiciones de crecimiento y test de crecimiento en siembra por goteo.

1.1. Microorganismos utilizados.

1.1.1. Cepas bacterianas.

XL1 Blue: *recA1 endA1 gyrA96 (Na^r) thi1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lacF'*[*proAB lacI^q lacZΔM15 Tn10 (Tetr)*]. Se usó rutinariamente para la amplificación de ADN plasmídico y en la α -complementación del gen *lacZ*.

DH5 α : (Φ 80*dlacZΔM15*) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(laZYA-argF)* U169. Utilizada en la amplificación de ADN plasmídico en condiciones en las que no se conseguía con XL1Blue. En la actualidad es la cepa más usada en el laboratorio.

SCS110: *rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)* F'[*traD36 proAB lacIqZΔM15*]. Su uso para la obtención de ADN plasmídico no metilado.

1.1.2. Cepas de levaduras.

En este trabajo se utilizó como cepa silvestre a la cepa NCYC 495 *leu2⁻ ura3⁻* de *H. polymorpha*. En el Apéndice I se presenta un inventario de las cepas usadas en este trabajo, sus genotipos, así como su denominación y procedencia. Las cepas construidas en numerosas ocasiones mantenían ciertas auxotrofias. Con el fin de evitar la comparación de resultados entre cepas auxotroficamente diferentes y los posibles efectos de la adición al medio del compuesto necesario para su crecimiento, las cepas utilizadas para los ensayos fueron complementadas mediante la transformación con los plásmidos p18B1, pGEMLEU2 y pBSURA3, que portan respectivamente los genes de *H. polymorpha* *LEU2* [2] y *URA3* [199].

1.2. Medios y condiciones de cultivo.

Se utilizaron medios de cultivo sólidos y líquidos tanto para levaduras como para bacterias, disolviéndose los componentes en agua destilada y tamponándolos cuando fuera necesario. Para los medios sólidos se añadió antes de esterilizar, Bacto-Agar a una concentración del 2% (p/v). La esterilización se realizó mediante el uso de Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

una autoclave Raipa AE-75-DRY (Raipa, España) durante 20 min a 121°C y 1.1 bar de presión. Los compuestos termolábiles se añadieron al medio autoclavado a partir de una solución concentrada y esterilizada por filtración a través de filtros Millex de 0.22 µM (Millipore, EEUU).

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

1.2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano.

El medio de crecimiento utilizado de forma rutinaria fue LB (Luria Bertani), tanto para crecimiento en medio líquido como en medio sólido. Para los medios sólidos se añadió Bacto-Agar a una concentración de 1.5% (p/v). En la preparación de células competentes para la transformación con ADN plasmídico, se usó el medio SOB. La incubación de las células tras la transformación se llevo a cabo en medio SOC, con idéntica composición que el SOB y suplementado además con 20 mM de glucosa. Los antibióticos necesarios se añadieron al medio estéril una vez filtrados a partir de una solución concentrada 500 veces. Las concentraciones finales fueron: 50 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de estreptomicina.

Las bacterias se cultivaron habitualmente a 37°C en medio sólido y líquido con agitación orbital de 200 rpm. En la amplificación de ciertos vectores fue necesario el uso de temperaturas de 30°C, sobre todo para aquellos que portaban grandes fragmentos de *YNTI* u otras proteínas de membrana, como *HAKI* y *TRKI*. En estos casos las bacterias eran incapaces de crecer a temperaturas superiores, posiblemente por la toxicidad que le acarrearía ciertos niveles de expresión de estos transportadores. El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la densidad óptica a 595 nm.

La conservación de las cepas bacterianas durante largos períodos de tiempo se realizó mediante congelación a -80°C en glicerol al 15% (v/v).

Medio LB	Medio SOB
Triptona 1%	Triptona 2% (p/v)
Extracto de levadura 0.5% (p/v)	Extracto de levadura 0.5% (p/v)
NaCl 1% (p/v)	10 mM de NaCl
Ajustado a pH 7 con NaOH 1N	2.5 mM de KCl
	10 mM de MgCl ₂ ¹
	10 mM de MgSO ₄ ¹

¹ Se añadieron al medio esterilizado a partir de disoluciones concentradas estériles.

Cuando fue necesaria la selección por color de colonias (α -complementación del gen *lacZ*) 50 μ l de X-gal a 50 mg/ml y 100 μ l de IPTG a 100 mM se extendieron en cada placa de LB-agar al menos 30 min antes de sembrar las bacterias.

1.2.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de levaduras.

El crecimiento de *H. polymorpha* en medio rico no selectivo se llevó a cabo en YPD. En lo que respecta al crecimiento en medio definido se realizó usando “Yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulfate” (YNB, Difco, EEUU) que contiene todos los cofactores y vitaminas necesarios. De forma general el medio mínimo contiene YNB al 0.17% (p/v) y 2% de glucosa (p/v), recibiendo el nombre de YG. La adición de la fuente nitrogenada a este medio en forma de cloruro amónico, recibió el nombre de YGNH, y cuando se añadió nitrato sódico, pasó a denominarse YGNO. En ciertas ocasiones para el crecimiento en medio sólido se empleó el medio YGAS cuya composición consta de 2% glucosa (p/v) e YNB con sulfato de amonio (5 g/l). Cuando fue necesario el empleo de medios sin potasio se usó el medio YNB-F 0.17% (ForMedium, England) que además de carecer de aminoácidos y de amonio, carecía de la fuente de potasio. En algunas ocasiones combinamos medios sin potasio y con alguna fuente nitrogenada como el nitrato, la glutamina e incluso sin ninguna fuente de nitrógeno. En estos casos, elaboramos el medio de cultivo siguiendo la misma composición del YNB (Difco), ya que el YNB-F tenía trazas de amonio. Para experimentos más específicos se emplearon otros medios que son detallados en el momento de su aplicación.

Las placas con sulfito sódico requieren una preparación específica, ya que estas placas necesitan realizarse a pH ácido y en estas condiciones se produce la hidrólisis del agar. Es por ello por lo que se preparó el agar al 4% y separado del resto de los componentes del medio. El medio al doble de su concentración final fue tamponado a pH

3.5 con 150 mM de ácido tartárico. Una vez autoclavado se mezcló a partes iguales hasta un volumen final de 25 ml/placa y se le añadió la cantidad deseada de Na₂SO₃. La disolución stock de Na₂SO₃ siempre se preparó en el momento de usar para prevenir su oxidación.

Medio (YPD)	YGNH / YGNO
Glucosa 2% (p/v)	YNB 0.17%
Peptona 2% (p/v)	Glucosa 2% (p/v)
Yeast Extract 1% (p/v)	5 mM NH ₄ Cl / NaNO ₃

Las auxotrofías para el uracilo y la leucina se suplieron añadiendo estos compuestos a concentraciones de 0.18 mM y 0.23 mM respectivamente a partir de soluciones stock 50 veces concentradas y esterilizadas mediante autoclave. Para la selección de células portadoras del gen *ble* que confiere resistencia al antibiótico zeocina (Invitrogen, EEUU), el medio YPD tamponado con 50 mM MES-Tris pH 6.1 fue suplementado con este antibiótico a una concentración final de 100 µg/ml a partir de una disolución concentrada (100 mg/ml), manteniéndose en condiciones de oscuridad.

La temperatura habitual de crecimiento fue de 37°C, aunque para algunas cepas fue necesario disminuirla a 30°C como consecuencia de su termosensibilidad. Cuando se crecieron en medio líquido se utilizó una agitación orbital de 200 rpm. La determinación del crecimiento se realizó midiendo la densidad óptica del cultivo a 660 nm. Esta levadura presenta una relación lineal entre la DO₆₆₀ y la concentración de células del cultivo durante su fase exponencial, según la fórmula:

$$1 \text{ U DO}_{660} \approx 3.75 \text{ mg/ml (peso fresco)} \approx 7 \cdot 10^7 \text{ células/ml (A)}$$

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

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

La inducción de los genes de la vía de asimilación de nitrato se realizó de forma similar al siguiente protocolo. Las células se crecieron en YGNH durante la noche con 5 mM de cloruro de amonio hasta una DO₆₆₀ de 2.7. A continuación se

recogieron por centrifugación a $4863 \times g$ durante 7 min, se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en el medio de inducción YGNO durante 90-120 min. La concentración de nitrato varió entre 0.5 y 10 mM según el experimento. En ocasiones, con el fin de aumentar los niveles de inducción, las células se incubaron de 1 a 2 horas en un medio sin fuente de nitrógeno (YG).

1.3. Test de crecimiento mediante siembra por goteo.

La siembra por goteo junto con el crecimiento en medio líquido, permitió caracterizar las cepas de levadura en cuanto a la capacidad de crecer en medios con distintas composiciones. En el goteo, se depositó sobre medio sólido en forma de pequeñas gotas de 5 μL 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 μl de cultivo que se pasaron a tubos tipo eppendorf de 1.5 ml estériles. Las células fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 30 s y resuspendidas en 200 μl de agua estéril para eliminar el YPD. La densidad óptica de las suspensiones celulares diluidas 1/10 se determinó por triplicado a 660 nm usando el lector de microplaca placas SynergyTM HT (BioTek, EEUU) y a partir de ésta, se estimó el número de células por ml según la expresión (A) (apartado 1.2.2. de materiales y métodos). Se prepararon cinco diluciones a partir de la suspensión que permitiesen tomar en un volumen de 5 μl 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 células. Las diluciones se prepararon en placas multipocillos previamente esterilizadas mediante UV con la ayuda de una pipeta multicanal (Finnpipette BioControl, Thermo Labsystems, Finlandia). Finalmente, la siembra en los medios se realizó también con la pipeta multicanal. Para ello las placas de Petri se colocaron sobre un molde en el que aparecen 5 columnas y 8 filas de círculos permitiendo una siembra de hasta 8 cepas por placa y 5 diluciones de cada una de ellas.

2. Transformación de microorganismos.

2.1. Transformación de bacterias (*E. coli*).

La transformación de *E. coli* se realizó por choque térmico o mediante electroporación. Para la obtención de células competentes de *E. coli* se desarrolló el

protocolo descrito por Hanahan [119]; y para las células electrocompetentes se siguió las recomendaciones del fabricante del electroporador BTX 600 (Electro Cell Manipulator®600, EEUU).

Para la obtención de células competentes se partió de un preinóculo crecido en 5 ml de LB hasta fase estacionaria con tetraciclina para el caso de *XLI Blue* y con estreptomicina para la cepa *SCS110*, mientras que para *DH5α* no se usó ningún antibiótico. Se inocularon 150 ml de medio SOB (suplementado o no con el antibiótico correspondiente) con 0.18 volúmenes del preinóculo, y se mantuvo creciendo hasta fase exponencial ($DO_{590} = 0.4 - 0.6$) a 37°C. Alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó durante 5 min, a 4°C y a 4863 x g. Las células se resuspendieron en 1/3 volúmenes de la solución RF1 fría (50 ml), se incubaron en hielo durante 20 min, centrifugándose igual que en el paso anterior. En este punto las células se resuspendieron en 1/12 volúmenes del tampón RF2 frío (12 ml), incubándose 20 min en hielo. Se prepararon alicuotas de 200 µl en tubos eppendorf estériles que se pasaron por nitrógeno líquido antes de ser almacenados a -80°C.

Tampón RF1	Tampón RF2
100 mM RbCl	10 mM de MOPS
50 mM MnCl ₂ · 4H ₂ O	10 mM de RbCl
30 mM de acetato de sodio	75 mM de CaCl ₂ · 2H ₂ O
10 mM de CaCl ₂ · 2H ₂ O	15% de glicerol (v/v)
15% de glicerol (v/v)	
Ajustar el pH a 5.8 con ácido acético. Esterilizar por filtración.	Ajustar a pH 6.8 con NaOH. Esterilizar por filtración.

Para la transformación por choque térmico se añadió a las células previamente descongeladas el ADN (en un volumen no superior a 10 µl), incubándose la mezcla en hielo durante 30 min. Posteriormente, se incubó la mezcla 90 s a 42°C (choque térmico) y se transfirieron a hielo durante 2 min. Se añadieron 800 µl de SOC y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación (200 rpm). Finalmente las células se recogieron a la máxima velocidad en una microcentrifuga durante 30-60 s y se sembraron en placas de LB agar suplementadas con los antibioticos adecuados. Los transformantes se seleccionaron en la mayoría de los casos por su capacidad para crecer en presencia de ampicilina, salvo en el caso del plásmido pEYFP-N1 que poseía el gen de resistencia a kanamicina. Para la selección por color de las colonias transformadas con el plásmido

pGEMT-*Easy* (α -complementación del gen *lacZ*) [258], las células se sembraron en placas de LB-agar sobre las que se extendieron 50 μ l de X-gal 50 mg/ml (Promega, EEUU) y 100 μ l de IPTG 100 mM (Promega, EEUU) al menos 30 min antes de la siembra. El color azul de las colonias se intensificó incubando las placas a 4°C.

En ciertas ocasiones se requería eficiencias de transformación superiores a 10^6 transformantes/ μ g de ADN, por lo que fue necesario el uso de la electroporación. Las bacterias electrocompetentes aumentan en 2 órdenes de magnitud la cantidad de bacterias transformadas respecto al choque térmico (10^9 transformantes/ μ g de ADN). Para su obtención se inoculó de la misma manera que para el caso anterior, 150 ml de SOB con o sin antibiótico, en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó la DO_{595} 0.8. Se recogieron centrifugando el cultivo a 4863 x *g* durante 15 min. Las células fueron lavadas con 1 volumen de WB (10% glicerol + 90% agua destilada) frío y estéril. Se recogieron de la misma forma y se lavaron con 0.5 volúmenes de WB frío (75 ml). El siguiente lavado se realizó con 0.02 volúmenes de WB (3 ml) bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente se resuspendieron las células en 300–450 μ l de WB frío, almacenándose a –80°C en volúmenes de 40 μ l.

En la transformación por electroporación la mezcla de transformación se colocó en el fondo de una cubeta de electroporación fría de 2 mm de separación entre electrodos aplicándose un pulso de 5 ms (campo eléctrico de 1,5 KV·cm⁻¹, 50 μ F de capacitancia y 129 Ω de resistencia). Inmediatamente después del pulso se añadieron 800 μ l de SOC para resuspender las células suavemente. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación y se sembró en placas de LB con el antibiótico adecuado.

2.2. Transformación de *H. polymorpha*.

La preparación y transformación de células competentes de *H. polymorpha* se realizó siguiendo el protocolo descrito por [86]. Para la obtención de células competentes se partió de un preinóculo crecido hasta fase estacionaria a 37°C en medio líquido YPD. A continuación se inocularon aproximadamente 0.6 volúmenes en 50 ml de YPD previamente precalentado a 37°C en agitación, dejando crecer el cultivo hasta fase exponencial (DO_{660} = 1.2-1.5). En ese momento, se recogieron las células por centrifugación a 4863 x *g* durante 5 min y se resuspendieron en 0.2 volúmenes de tampón fosfato (KPi) suplementado con 25 mM de DTT (Promega, EEUU). Las células en estas condiciones se incubaron a 37°C durante 15 min, para luego recogerlas por

centrifugación y lavarlas dos veces con tampón de electroporabilización frío (STM). Un primer lavado con 1 volumen de tampón (50 ml) y un segundo con 0.5 volúmenes (25 ml), recogiendo las células entre cada paso por centrifugación.

Finalmente, se resuspenden en 0.005 volúmenes de STM (250 μ l), lo que da lugar a una concentración aproximada de 2×10^{10} células/ml. Se separan en alícuotas de 60 μ l que se usaron inmediatamente o se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

KPi (50 mM)	DTT	STM
A partir de: 1 M de K_2HPO_4 1 M de KH_2PO_4	Preparar una solución 1M en 10 mM de acetato de sodio.	270 mM de sacarosa 10 mM de Tris-HCl 1 mM de MgCl_2
Ajustar a pH 7.5. Autoclavar.	Ajustar pH a 5.2. Esterilizar mediante filtración.	Ajustar a pH 7.5. Autoclavar

Las transformaciones se realizaron con 0.5-1 μ g de ADN en un volumen no superior a 10 μ l. El ADN se añadió a 60 μ l de suspensión celular previamente descongelada sobre hielo y la mezcla de transformación se sometió a las condiciones de electroporación indicadas anteriormente para bacterias (campo eléctrico de $1,5 \text{ KV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 50 μ F de capacitancia y 129 Ω de resistencia). Tras el pulso se añadió a la cubeta 1 ml de YPD y se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora sin agitación. Las células se recogieron mediante centrifugación durante 60 s a $16060 \times g$, se lavaron con 1 ml de agua estéril y se resuspendieron en 150-200 μ l de agua MilliQ estéril. La siembra se realizó en el medio apropiado para la selección de los transformantes, variando la eficiencia del método en función de la cepa y del tipo de vector utilizado.

3. Manipulación de extractos proteicos.

3.1. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares.

Para los ensayos de actividad enzimática y el análisis de proteínas mediante SDS-PAGE fue necesario determinar la concentración de proteínas de los extractos. Para ello se usó el método Bradford [32] utilizando el kit comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, EEUU). Los extractos se diluyeron entre 5 y 10 veces, utilizando 5 y 10 μ l de la dilución para determinar la concentración de proteínas al añadirles 200 μ l del reactivo Bradford dejando desarrollar el color durante 5 min. La γ -globulina bovina

se usó como proteína patrón, realizando todo el ensayo en placas multipocillos en las que se determinó la absorbancia a 590 nm utilizando el lector de placas SynergyTM HT (BioTek, EEUU).

3.2. Ensayos de actividad nitrato reductasa y β -galactosidasa.

3.2.1. Obtención de extractos celulares para el ensayo de la actividad nitrato reductasa y β -galactosidasa.

Los extractos libres de células de *H. polymorpha* se obtuvieron a partir de células crecidas hasta fase exponencial (DO_{660} 2.7) mediante rotura mecánica con bolas de vidrio (\varnothing 0.5 mm). Se partió de 50 mg de células (peso fresco) recogidas por centrifugación durante 8 min, 4°C, a 1750 x g (3000 rpm), en tubos de vidrio de fondo redondo, lavadas con agua fría y congeladas a -20°C hasta su uso. Para la rotura celular se añadieron a las células congeladas 250 μ l de tampón de extracción frío suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas siguiendo las recomendaciones del fabricante (Complete Mini, Roche, Alemania). Las células se resuspendieron mediante agitación con vórtex y se transfirieron a tubos de 1.5 ml, a los que se les añadieron bolas de vidrio. A continuación, las células se homogenizaron mediante agitación vigorosa en un homogenizador Fast Prep (Thermosavant LifeSciences, UK) durante 20 s a una velocidad de 6.0 m/s. Tras enfriar los viales en hielo se perforaron en su parte inferior con una aguja candente y se introdujeron en un tubo eppendorf. Se centrifugaron a 820 x g (3200 rpm) durante 1 minuto para un primer aclarado de los extractos. El sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación a 10580 x g (13000 rpm) durante 10 min a 4°C con el fin de purificar completamente el extracto proteico de restos celulares y de gran parte de las membranas celulares. En estos extractos se determinaron los niveles de proteína y se usaron para medir las actividades nitrato reductasa y β -galactosidasa.

Tampón de extracción

Tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.4
EDTA 1 mM
FAD 20 μ M

3.2.2. Ensayo de la actividad nitrato reductasa.

El método se basa en la transformación de nitrato en nitrito por unidad de tiempo en las condiciones de la reacción. La actividad nitrato reductasa se determinó en un volumen de 500 μl . La mezcla de reacción contenía 250 μl de tampón de ensayo y de 10-20 μl de extracto, completándose hasta 450 μl con agua. Esta mezcla se incubó a 30°C iniciándose la reacción mediante la adición de 50 μl de 2 mM de NADH. Después de 15 min la reacción se detuvo al añadirle 500 μl de N-(1-naftil)-etilendiamina 0.02% (p/v) (reactivo A) y 500 μl de sulfanilamida 1% (p/v) en HCl 1% (v/v) (reactivo B) [278]. Estas dos soluciones permiten la detección colorimétrica del nitrito mediante una reacción de diazotización, formándose un compuesto azo que absorbe a 540 nm. El desarrollo de color es proporcional a la concentración del ión. La actividad específica nitrato reductasa se expresa como: $\text{nmoles de nitrito} \cdot \text{minuto}^{-1} (\text{mU}) \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$; y se calculó según la fórmula:

$$\text{Act. NR} = [(DO_{540}/pdte)] / [V_{\text{extracto}}(\text{ml}) \cdot \text{proteínas totales (mg/ml)} \cdot \text{tiempo (min)}]$$

Tampón de ensayo NR

Tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,4
 NaNO₃ 40 mM
 FAD 40 μM

3.2.3. Ensayo de la actividad β -galactosidasa.

Se siguió el protocolo descrito por [252]. La actividad β -galactosidasa se estimó a partir de volúmenes de extractos entre 15 y 30 μl , usando 450 μl de tampón de ensayo (tampón Z) y completando con agua hasta 500 μl . Esta mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 5 min y a continuación se disparó la reacción añadiendo 100 μl de ONPG preparado en el momento a una concentración de 4 mg/ml en tampón Z. La reacción se dejó desarrollar hasta la aparición del color amarillo y en ese momento se detuvo añadiendo 250 μl de Na₂CO₃ 1 M. La absorbancia se determinó a 420 nm, de manera que 0.0045 unidades de A₄₂₀ corresponden a 1 nmol/ml de *o*-nitrofenol producido. La actividad específica se expresa en $\text{nmoles de } o\text{-nitrofenol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ y se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Act. } \beta\text{-gal} = [(DO_{420}) / (0.0045 \cdot V_{\text{extracto}}(\text{ml}) \cdot \text{proteínas totales} (\text{mg/ml}) \cdot \text{tiempo} (\text{min}))]$$

Tampón Z

Tampón fosfato sódico 100 mM pH 7
KCl 10 mM
MgSO₄ · 7H₂O 1mM
β-mercaptoetanol 0.27% (v/v) (se añade en el momento)

3.2.4. Determinación de la actividad β-galactosidasa *in situ* a partir de células de levaduras permeabilizadas con cloroformo sobre filtros.

Este sistema de ensayo de la actividad β-galactosidasa permite determinar de forma cualitativa y rápida esta actividad, resultando muy útil, por ejemplo, para la búsqueda de cepas portadoras de tal construcción (gen reportero *lacZ* fusionado a un determinado promotor) y con menor número de copias. Para ello, los transformantes se siembran en placas a modo de estrías con ayuda de un palillo estéril en el medio apropiado (YPD, YGAS, YGNH) y en el caso de que estemos trabajando con un promotor inducible, se siembran en el medio de inducción. Por ejemplo, cuando trabajamos con cepas que portan la construcción del promotor de *HAK1* fusionado a *lacZ*, se siembran en medios con concentraciones limitantes de K⁺ (0.05 mM KCl) para favorecer la inducción de este promotor, y por tanto, la expresión del gen *lacZ*. Tras 48 h de crecimiento a 37°C, se colocaron filtros de papel Whatmman 3 MM, orientados sobre las placas para permitir la transferencia de las células a estos filtros.

La permeabilización de las células se logró sumergiendo los filtros en cloroformo durante 5 min de forma que las células quedaran hacia abajo, para favorecer la permeabilización de las mismas. Una vez terminado la incubación y eliminado el cloroformo de los filtros por evaporación, éstos se pusieron en contacto con la mezcla de reacción (Tampón Z, 1 mg/ml de X-gal y 0,27% de β-mercaptoetanol) al en una placa de Petri. Se empelaron 1.5 ml de mezcla de reacción por filtro. La actividad β-galactosidasa, detectable por la coloración azul que adquieren las células, se aprecia a los 15-20 min. Las células que no portan la construcción no presentan esta coloración azul.

3.3. Obtención de extractos de proteínas solubles para SDS-PAGE.

La obtención de extractos de proteínas solubles se realizó siguiendo básicamente el protocolo indicado en el punto 3.2.1 de materiales y métodos pero con un tampón de extracción diferente. Después de la centrifugación a 10580 x g a 4°C durante 10 min, se le añadió al sobrenadante un volumen de tampón de desnaturalización al 4X y se incubó a 100 °C durante 7 min.

Tampón de extracción	Tampón de desnaturalización (4X)
Tris-HCl 50 mM pH 7.5	Tris-HCl 150 mM pH 7
EDTA 15 mM ¹	SDS 12% (p/v)
EGTA 15 mM ¹	β-mercaptoetanol 6% (v/v)
Na ₂ P ₂ O ₇ 10 mM ²	Glicerol 30% (v/v)
NaN ₃ 10 mM ²	Azul de bromofenol 0.05% (p/v)
NaF 10 mM ²	
PMSF 2 mM	
Inhibidores de proteasas	
¹ Inhibidores de kinasas;	
² Inhibidores de fosfatasa.	

3.4. Obtención de extractos de proteínas de membrana para SDS-PAGE.

Para la obtención de extractos de proteínas de membrana se homogenizaron de 50-100 mg de células en las condiciones indicadas en el punto 3.2.1. Tras la primera centrifugación para separar los extractos de las bolas de vidrio y restos celulares, éstos fueron clarificados mediante dos o más centrifugaciones sucesivas como en las condiciones anteriores (820 x g durante 1 min). El sobrenadante resultante se centrifuga finalmente a 20500 x g (15000 rpm) durante 45 min a 4°C, para obtener una fracción enriquecida en membrana plasmática. Al finalizar la centrifugación se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 75 µl de una solución de Tritón X-100 al 0.025% (p/v) en agua con la ayuda de una micropipeta. De este volumen, 5-10 µl se usaron para determinar la concentración de proteínas y a 60 µl de estos extractos se les añadió 20 µl de tampón de desnaturalización al 4X. Finalmente estos tubos se calentaron 30 min a 40°C para luego congelarse a -20°C hasta su uso.

3.5. Tratamiento de los extractos proteicos con λ -proteína fosfatasa.

Para la defosforilación de proteínas se usaron 20 μ g de extractos proteicos para Hak1 o 100 μ g para Npr1. Los extractos se obtuvieron como se indica en los apartados anteriores con la diferencia de que el tampón de extracción carecía de inhibidores de fosfatasas y quinasas. Se incubaron en presencia de 150-400 U de λ -proteína fosfatasa (New England Biolabs, Reino Unido) durante 25 min a 30°C en presencia del tampón de la enzima y de $MnCl_2$ a una concentración de 2 mM. Después del tratamiento con λ -proteína fosfatasa se añadió tampón de desnaturalización al 4X y se calentaron los extractos a 40°C durante 30 min en el caso de proteínas hidrofóbicas, o a 100°C durante 7 min.

Tampón de reacción de λ -proteína fosfatasa

Tris-HCl 50 mM pH 7.5

EDTA 0.1 mM

DTT 5 mM

Brij35 0.01% (p/v)

3.6. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo utilizando minigeles discontinuos de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), siguiendo las indicaciones del Mini-Protean II (Bio-Rad, EEUU). La solución de acrilamida/bisacrilamida se preparó al 30% (p/v) monómero total con 2,67% (p/v) de entrecruzamiento. La concentración de SDS fue del 0.1% tanto en los tampones como en los geles. Se utilizó la técnica de electroforesis discontinua con el empleo de un gel de compactación de 2 cm, al 4% de acrilamida, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8; y un gel inferior de resolución con un porcentaje de acrilamida comprendido entre 8-14% (p/v) según la aplicación, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8. En la electroforesis se aplicaron tres diferencias de potencial: 50 V hasta que las muestras entran completamente en el gel, 150 V para producir una buena compactación de la misma dentro del gel de compactación y 100 V una vez en el gel de resolución hasta la finalización de la electroforesis.

Tampón de electroforesis (pH 8.3)	Acrilamida-bisacrilamida 30%T, 2.67% C
Tris 25 mM	Acrilamida 29.2% (p/v)
Glicina 192 mM	N'N'-bis-metilén-acrilamida 0.8% (p/v)
SDS 0.1% (p/v)	

Para identificar correctamente las bandas de distintos pesos moleculares así como para estimar la evolución de la electroforesis y de la transferencia se usaron los marcadores moleculares coloreados “Kaleidoscope prestained standards” o “Dual Color prestained standards” (Bio-Rad, EEUU).

La visualización de las proteínas separadas se realizó por inmersión del gel de poli-acrilamida en una disolución de tñido Coomassie durante 20 min con agitación suave. Posteriormente se eliminó el exceso de colorante por inmersión del gel en la disolución de decoloración rápida (entre 15 y 30 min).

Disolución de tñido	Disolución de decoloración rápida
Coomassie brilliant blue R-250 0.1% (p/v)	Metanol 40% (v/v)
Metanol 50% (v/v)	Ácido acético 10% (v/v)
Ácido acético 10% (v/v)	

3.7. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis se transfirieron al soporte sólido PVDF (difluoruro de polivinilideno, Millipore, EEUU) siguiendo las recomendaciones del Mini-Trans Blot® (BioRad, EEUU). Este paso fue necesario para posteriormente inmunodetectar proteínas específicas (*immunoblot*). Las membranas se humedecieron en metanol durante unos 30 segundos y a continuación fueron sumergidas en tampón de transferencia durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se pusieron en contacto con los geles que habían sido incubados también en tampón de transferencia (10-15 min) para eliminar las sales del tampón de electroforesis. Las transferencias se llevaron a cabo a 4°C en tampón de transferencia con una diferencia de potencial constante de 100 V durante unos 90 min o toda la noche a 30 V. Al finalizar este periodo las membranas con las proteínas transferidas se procesaron transfiriéndolas a PBS-T o se dejaron secar a temperatura ambiente para conservarlas a 4°C hasta su utilización. En este último caso las membranas se activaban de nuevo en metanol y se enjuagaban en PBS-T.

Tampón de transferencia pH 8.3

Tris 25 mM
Glicina 192 mM
Metanol 20% (v/v)

3.8. Inmunodetección de proteínas en membranas (immunoblot).

El primer paso para la inmunodetección de proteínas transferidas a membrana fue el bloqueo de las membranas con solución de bloqueo (leche desnatada en polvo La Asturiana al 5% (p/v) en PBS 1X con Tween20 al 0.1% (v/v)) durante 30-60 min a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario a la concentración adecuada para cada anticuerpo (Tabla 8) en una disolución al 0.5% de leche en PBS-T (PBS 1X con Tween20 al 0,1% (v/v)) durante 45-60 min o a 4°C durante 12-14 horas. A continuación se lavaron las membranas para eliminar el exceso de anticuerpo con PBS-T, realizando tres lavados sucesivos de 5, 7 y 9 min respectivamente. Tras el último lavado se incubaron las membranas durante 30-60 min con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano a la concentración que se indica en la tabla 8. Seguidamente se retiró el exceso de anticuerpo secundario lavando las membranas de la misma forma que para el anticuerpo primario. La detección se realizó usando el sistema quimioluminiscente Immobilon Western HRP Substrate (Millipore, EEUU) según recomendaciones del fabricante. La señal quimioluminiscente se detectó directamente usando la cámara CCD del sistema de análisis ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, EEUU) o por impresión de una película radiográfica. En este último caso, la película se documentó utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EEUU).

PBS-T (pH 7.4)

Na₂HPO₄ 10 mM
KH₂PO₄ 1.78 mM
NaCl 136 mM
KCl 2.7 mM
Tween®20 0.1% (v/v)

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en este trabajo y concentraciones de uso.

	Antígeno	Características	Dilución empleada	Origen
Anticuerpos primarios	Ynr1	Inmunosuero de conejo	1:1.500	GMN
	Ynr1	Inmunosuero de conejo	1:1.000	GMN
	Ynt1	Inmunosuero de conejo	1:1.500	GMN
	ScPma1	Inmunosuero de conejo	1:5.000	Dr. Ramón Serrano ²
	HA	Anticuerpo monoclonal	1:1.000	Roche
	GFP	Anticuerpo monoclonal	1:1.000	Roche
Anticuerpos secundarios	IgG de ratón	Inmunosuero de oveja	1:10.000/ 1:3.000 ¹	Roche
	IgG de conejo	Inmunosuero de cabra	1:50.000	Amersham

GMN: Grupo del Metabolismo del Nitrógeno

¹, Se usó esta dilución para la detección de GFP.

², Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC.

3.9. Determinación del transporte de nitrato de alta afinidad.

El método usado se basa en medir la desaparición del nitrato del medio extracelular por unidad de tiempo. Aproximadamente 50 mg de células crecidas en amonio se recogieron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en 4.8 ml de YG tamponado con 25 mM de MES-Tris pH 5.5. Se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml y se incubaron en un baño con agitación a 37°C. Tras 2 min en tales condiciones, la determinación del transporte de nitrato se inició con la adición de 50-100 µM de nitrato sódico tomándose muestras de 200 µl en los tiempos de 1, 3, 6, 9, 12, 15 min. Este volumen se vertió en tubos eppendorf de 1.5 ml con 100 µl de HCl 0.35 M para detener la reacción. Al finalizar el ensayo se midió la densidad óptica a 660 nm del cultivo para determinar la concentración de células y se neutralizaron las muestras con 40 µl de Tris 1 M. La concentración de nitrato en cada muestra se determinó a través de la conversión enzimática del nitrato a nitrito. Se utilizó la nitrato reductasa de *H. polymorpha* (The Nitrate Elimination Company, EEUU) usando NADH como donador de electrones. El nitrito se estimó colorimétricamente. El ensayo se realizó en placas multipocillos mediante el siguiente protocolo. Las muestras neutralizadas con Tris se

centrifugaron a la máxima velocidad durante 5 min para retirar las células. El sobrenadante en un volumen de 30 μ l se transfirió por duplicado a una placa multipocillo. A uno de los volúmenes se le añadió 30 μ l de agua para estimar la concentración de nitrito del medio. A los otros 30 μ l de muestra se le añadió 30 μ l de la mezcla de ensayo que contenía la nitrato reductasa y el donador de electrones. En la placa multipocillo también se cargó una curva patrón de nitrato. A continuación se incubó la placa a 30°C durante 1 h y transcurrido este tiempo se añadieron 60 μ l de solución B (N-(1-naftil)-etilendiamina 0.02% (p/v)) y 60 μ l de solución A (sulfanilamida 1% (p/v) en HCl 1% (v/v)) y se dejó desarrollar el color durante 15 min. Estas soluciones permiten determinar la concentración de nitrito colorimétricamente a 540 nm. Para la obtención de los valores de consumo de nitrato se representó el valor de la absorbancia del nitrito frente al tiempo, tomándose los valores de la pendiente en el tramo lineal. Este valor se corresponde al transporte de nitrato en $\text{nmoles nitrato} \cdot \text{min}^{-1}$ y se normaliza con la concentración de células del ensayo. Las condiciones para el ensayo sufrieron variaciones en los distintos experimentos, principalmente en lo referente a la concentración de nitrato empleada o a los tiempos tomados.

Mezcla de ensayo para la determinación de nitrato

Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5

EDTA 0.05 mM

NADH 150 μ M

Nitrato reductasa 7.5×10^{-5} U/ml

Mediante este procedimiento se mide exclusivamente el transporte mediado por el sistema de transporte de alta afinidad ya que se parte de una concentración muy baja de nitrato en el medio. En *H. polymorpha* existe un único transportador de alta afinidad (Ynt1) [227]. Por otra parte, en esta tesis se utiliza el término de transporte para referirnos a ensayos de captación de nitrato en los que se realiza una inducción previa con nitrato y el transporte se mide con concentraciones muy bajas de nitrato. Por el contrario, el término consumo de nitrato se reserva para referirnos a experimentos en los que el consumo de nitrato se determina simultáneamente a la inducción de la vía de asimilación de nitrato.

3.10. Determinación de la velocidad de consumo de nitrato y nitrito.

Este método también se basa en medir la desaparición del nitrato o nitrito del medio de cultivo. Para el nitrato se toman muestras de una suspensión de levaduras tamponada a pH 5.5 a determinados intervalos de tiempo para valorar posteriormente la concentración de nitrato en cada una de ellas mediante su transformación enzimática a nitrito. Inicialmente las células se crecen en YGNH 5 mM hasta una DO_{660} de 2.7, tras lo cual se recogen y se lavan, resuspendiéndolas finalmente en un medio libre de fuentes nitrogenadas, más concretamente en YG 25 mM MES-Tris pH 5.5 durante 90 minutos, con el fin de poder eliminar el resto de NH_4Cl , para evitar que interfiriera en el consumo de nitrato y de nitrito. Transcurrido este tiempo se añadió el nitrato o el nitrito a la concentración deseada, generalmente 0.5 mM de nitrato o 1 mM de nitrito y se tomaron muestras a intervalos de tiempo cortos. Se tomaron 200 μ l de muestra que se vertieron en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 100 μ l de HCl 0.35 M para parar el transporte, en el caso de que estuviéramos midiendo el consumo de nitrato; pues en el caso de cuantificar el consumo de nitrito, los 200 μ l de cultivo se recogieron sobre 200 μ l de solución B. La concentración de nitrato en las muestras se cuantificó de forma similar a la explicada en el apartado anterior.

El nitrito se reveló colorimétricamente a 540 nm añadiendo 200 μ l de solución A. La concentración de células se estimó midiendo la DO_{660} del cultivo.

3.11. Determinación del transporte de nitrito de alta afinidad.

El transporte de nitrito se determinó como la desaparición extracelular de nitrito por unidad de tiempo. El transporte de nitrito se realizó siguiendo un protocolo similar al descrito para determinar el transporte de nitrato de alta afinidad, con la diferencia de que el nitrito fue determinado mediante el reactivo de Griess. Las células recogidas tal como indicamos en el apartado anterior se resuspendieron en un medio YG pH 5.5 (25 mM MES-Tris). El ensayo de transporte de nitrito se inició con la adición de 0.5-1 mM de nitrito. Las muestras de 200 μ l se vertieron en tubos eppendorf de 1.5 ml en los que se había añadido previamente 200 μ l de solución B para detener el consumo de nitrito. Una vez finalizado el ensayo, el nitrito se reveló colorimétricamente a 540 nm añadiendo 200 μ l de solución A. La concentración de células se estimó midiendo la DO_{660} del cultivo.

La velocidad de consumo de nitrito se obtuvo a partir de la pendiente del tramo lineal de la representación de la concentración de nitrito frente al tiempo y relativizada a la concentración de células del ensayo. Los valores de transporte de nitrito se mostraron como: nmoles de nitrito · min⁻¹ · mg de células⁻¹.

4. Técnicas microscópicas.

4.1. Tinción de vacuolas con FM4-64.

Para la visualización de las vacuolas en el microscopio de fluorescencia se utilizó el colorante vital lipofílico FM4-64 (Molecular Probes, EEUU). Este colorante es endocitado y dirigido a la vacuola donde queda retenido en la membrana vacuolar. Al protocolo de tinción aquí descrito se le introdujeron modificaciones como se detalla en cada caso. En todos los ensayos la vacuola se tiñe antes de incubar las células en los medios necesarios en cada caso. Aproximadamente 50 mg de células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 330 µl de YG o en medios sin K⁺ y se transfirieron a un tubo eppendorf, para luego añadirle 10 µM de FM4-64, a partir de una solución inicial de 1 mM disuelta en agua. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C protegidas de la luz. A continuación se vierte en 5 ml de medio fresco precalentado a 37°C. Al cabo de 1-2 horas de incubación se comenzó la observación de las vacuolas, ya en este tiempo se produce la correcta llegada a la membrana vacuolar del colorante. La permanencia de la fluorescencia a este nivel se alarga durante horas lo que permite ensayos largos sin necesidad de nuevas tinciones de la vacuola.

4.2. Tinción con DAPI.

La tinción de los núcleos se llevó a cabo utilizando el colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) según las indicaciones del fabricante (Roche, Alemania). Básicamente, el procedimiento consistió en recoger por centrifugación un volumen suficiente de células, generalmente 100 µl. Éste se resuspendió en 3-6 µl de agua y se añadió 1 µl de Tritón X-100 (10%) para favorecer la permeabilización del colorante al interior celular. A continuación, se añadió 1 µl de DAPI y se colocaron unos 5 µl de esta suspensión celular en el portaobjetos y se observó directamente en el microscopio de fluorescencia.

4.3. Tinción con el colorante vital azul tripán.

El azul tripán es un colorante que se utiliza en ensayos de viabilidad celular, ya que permite distinguir células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas, sin embargo, si atraviesa la membrana de las células muertas, que se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio. Para teñir las células con este colorante selectivo, se recogieron por centrifugación aproximadamente 50 µl de cultivo que fue resuspendido en el mismo volumen de azul tripán. La observación de las células al microscopio se realizó tras cargar 5 µl de esta suspensión sobre el portaobjetos.

4.4. Observación de las células en el microscopio de epifluorescencia.

La observación de la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente (GFP), por el colorante FM4-64 y por el DAPI, se realizó mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 50i equipado con una cámara 1200F (Nikon, Japón) equipado con los filtros adecuados. Se tomaron 5 µl de cultivo y se depositaron en un porta para su visualización directa mediante un el objetivo de inmersión 100X con AN 1,3. En ocasiones se determinó la fluorescencia de colonias de levadura directamente desde la placa de Petri y para ello se uso el objetivo de 4X con AN 0,10. Para la determinación de la fluorescencia de la GFP se usó el filtro GFP-B (Ex: 460-500, BA: 510-560), para visualizar la fluorescencia de FM4-64 se uso el filtro G2-A (Ex: 510-560, BA: 590) y para el DAPI se usó el filtro DAPI (Ex: 340-380, BA: 435-485). Para la captura de imagenes se usó el programa ACT-1 (Nikon, Japon) y para el tratamiento de la imagenes el programa Corel Photo Paint.

5. Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos.

Muchas de las tecnicas que se describen a continuación estan recogidas en el Sambrook (2001) [258].

5.1. Extracción de ADN plasmídico bacteriano a pequeña escala (“minipreps”).

Para la obtención de ADN plasmídico bacteriano las bacterias fueron crecidas a 37°C en 2-5 ml de medio líquido LB suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las bacterias portadoras del plásmido de interés. Tras la centrifugación

del cultivo durante 60 s a 16.060 x g se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 µl de tampón STET, se mezcló mediante vórtex y la mezcla se colocó en un baño con agua hirviendo durante 1 min. Las muestras se enfriaron en hielo durante 5 min para posteriormente centrifugarse a 16.060 x g durante 10 min. A continuación se eliminó con ayuda de un palillo estéril el sedimento mucoide que contiene restos celulares y ADN cromosómico. El ADN plasmídico presente en el sobrenadante, se precipitó durante 5 min añadiendo 200 µl de isopropanol. Este precipitado se recogió mediante centrifugación a 16060 x g durante 5 min y posterior lavado con etanol frío al 70% (v/v). Tras retirar el exceso de etanol mediante evaporación a 37°C se resuspendió el sedimento en 20 µl de agua.

Tampón STET

Tris-HCl 50 mM pH 8
Sacarosa 0.292 M
EDTA 50 mM
Tritón X-100 5% (p/v)

Este protocolo se usó de manera rutinaria para verificar las construcciones de ADN porque permite obtener de forma rápida ADN plasmídico de un pequeño volumen de cultivo. Sin embargo, la calidad del ADN no es muy buena, cuando se hizo necesaria la utilización de ADN plasmídico de mejor calidad y pureza se empleó el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Alemania), o el kit ilustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estos kits están basados en el procedimiento de lisis alcalina [30] y en la utilización de una resina de intercambio iónico inmovilizada en una columna que, en determinadas condiciones de pH y concentración salina, retienen selectivamente el ADN. El protocolo puede ajustarse a diferentes volúmenes de cultivo entre 1-5 ml.

5.2. Extracción de ADN total de levaduras.

Para la extracción de ADN total de levaduras se parte de un cultivo de células crecido en 5 ml de YPD hasta saturación. Las células se recogen mediante centrifugación a 4863 x g durante 7 min y se lavan con 1 ml de agua. A continuación se resuspenden en 0.5 ml de tampón de lisis y se pasan a un tubo eppendorf de 1.5 ml. En él se añaden bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro hasta alcanzar un volumen de 1.25 ml. La rotura se realiza utilizando el rompecélulas a una velocidad de 4 m/s durante 20

s. Posteriormente se recoge el sobrenadante y se le añade 250 µl de acetato de amonio 7 M a pH 7.0. La muestra se incuba durante 5 min a 65°C y luego se enfría durante 5 min en hielo. Transcurrido este periodo se le añade 500 µl de cloroformo, se agita y centrifuga durante 3 min a máxima velocidad. Se retira con cuidado la disolución acuosa de la mezcla, donde se encuentra el ADN y se transfiere a un nuevo tubo eppendorf. El ADN se precipita con 1 ml de isopropanol durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se recoge el precipitado mediante centrifugación a 16060 x g durante 5 min. El sedimento se lava con etanol frío al 70% y el exceso del mismo se retira mediante secado. El ADN genómico se resuspende en 80 µl de agua MilliQ.

Tampón de lisis

Tris-HCl 100 mM pH 8
EDTA 50 mM
SDS 1% (p/v)

Este protocolo permite obtener grandes cantidades de ADN pero con una alta contaminación de ARN. Por ello en determinadas situaciones se procedió a la eliminación de este ARN mediante el tratamiento con ARNasa. Concretamente, se añadió 1 µl de ARNasa a una concentración de 10 mg/ml y se incubó durante 30 min a 37°C. La precipitación del ADN se realizó con 100 µl de etanol/acetato de amonio 7.5 M (6:1) y posterior lavado con etanol frío al 70%. Las centrifugaciones se llevaron a cabo durante 10 y 4 min respectivamente a máxima velocidad. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ. El ADN obtenido mediante esta técnica tiene la suficiente calidad y cantidad como para ser usado en ensayos de PCR. Sin embargo, en algunas ocasiones fue necesaria una mejor calidad de este ADN y para ello se usó el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.3. Cuantificación del ADN.

Una estimación semicuantitativa de la concentración de ADN presente en las muestras extraídas se estimó al comparar la fluorescencia emitida tras la exposición a luz UV (302 nm) de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, con marcadores de peso molecular cuyas intensidades corresponden a cantidades conocidas de ADN. Los patrones utilizados fueron el fago λ (Promega, EEUU) digerido con la enzima de restricción *BstEII* (0.7- 8.5 kpb). Para fragmentos menores el patrón usado fue el

marcador de bajo peso molecular PCR Marker (700-50 pb) de NEBioLabs (New England Biolabs, Reino Unido).

Tabla 9. Relación entre tamaño y masa de las diferentes bandas del marcador λ ADN-*BstEII* y el marcador de bajo peso molecular, PCR Marker.

	Tamaño (pb)	Cantidad (ng) ¹
λADN-<i>BstEII</i>	8454	87,8
	7242	74,5
	6369	63,5
	5686	58,5
	4822	49,5
	4324	44,5
	3675	37,5
	2323	24
	1929	20
	1371	14
	1264	13
	702	7,25

¹Cargando 5 μ l de una solución de concentración 0.1 μ l/ μ l

	Tamaño (pb)	Cantidad (ng) ²
PCR Marker (NEB)	766	62
	500	40
	300	48
	150	61
	50	89

²Cargando 1 μ l de una solución de concentración 300 μ l/ml

5.4. Precipitación de ADN.

La precipitación con etanol es un método muy usado para eliminar las sales de los diferentes tampones utilizados durante la manipulación de los ácidos nucleicos, y devolverlos así, a disolución acuosa. Además es un método rápido, fácil y bastante eficiente que permite precipitar tanto ADN como ARN.

Para que ocurra la precipitación con etanol se han de usar sales que neutralicen las cargas negativas de los grupos fosfatos; entre todas ellas, nosotros recurrimos al acetato de sodio, cuando el tamaño de los fragmentos de ADN a precipitar son superiores a 0.5 kpb. Cuando fue necesario precipitar fragmentos de menor tamaño se substituyó el acetato de sodio por $MgCl_2$ a una concentración final de 0.01 M y 2.5 volúmenes de etanol frío al 96% (v/v).

Para comenzar con el protocolo, estimamos el volumen de la solución de ADN a precipitar para ajustar la cantidad de sal que debemos añadirle para que la concentración final sea la deseada (en nuestro caso sería de 0.3 M de acetato de sodio). Se mezcla bien la solución y se le añaden exactamente dos volúmenes de etanol frío (-20°C) al 96%. Se vuelve a mezclar y se almacena entre 15-30 min a -20°C para que se forme el precipitado. Éste se recoge por centrifugación a 20.500 x g a 4°C durante 15 min. Se elimina el sobrenadante con cuidado de no llevarnos el ADN, se lava el pellet con 750 µl de etanol frío al 70% y se recupera centrifugándolo a 20500 x g a 4°C durante 10 min. Después de retirar el sobrenadante se deja secar completamente a 37°C o en un concentrador (DNA-Plus System, Heto-Holten, Alemania) y se resuspende el pellet en agua o en el tampón deseado, teniendo la precaución de pasar el líquido por las paredes del eppendorf para recuperar el material que se haya podido quedar adherido.

5.5. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmentos de ADN ha sido utilizada en este trabajo con distintos objetivos: identificación de clones de bacterias, identificación de interrupciones génicas en levaduras, clonaje de fragmentos de ADN, obtención de fragmentos de ADN para transformar levaduras o determinación de la orientación de un inserto en una construcción.

En el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta ciertas precauciones generales como: evitar apareamientos intramoleculares, confirmar la ausencia de secuencias complementarias en los extremos 3' de cada pareja de cebadores, diseñarlos de forma que presentaran T_m (Temperaturas de melting) similares entre sí, y contenidos de C/G y A/T intermedios. Para el diseño de los cebadores empleados se recurrió al programa de la base de datos de *Saccharomyces* (*Saccharomyces* Genome Database: <http://genome-www.stanford-edu/Saccharomyces/>). La secuencia de los cebadores utilizados en este trabajo se recoge en el Apéndice III.

5.5.1. PCR a partir de ADN purificado.

El volumen final de las reacciones estuvo comprendido entre 20-100 µl, manteniendo las relaciones molares de todos los componentes según lo que se indica a continuación.

Tabla 10. Recoge las concentraciones de los reactivos que componen una reacción de amplificación.

ADN molde	5-100 ng
dNTPs	0.2 mM
MgCl₂	2.5 mM
cebador con sentido (5')	0.5 μM
cebador sin sentido (3')	0.5 μM
Tampón Taq polimerasa	1X
Taq DNA polimerasa	0.8-1.2 U/reacción
H₂O	Hasta 20-100 μl

La concentración de ADN molde varió en función de su origen, así para ADN plasmídico se usaron aproximadamente 10 ng de ADN, mientras que para ADN genómico de levaduras fueron necesarios 100 ng.

La ADN polimerasa usada fue la Taq ADN polimerasa de la casa comercial GenScript (EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tampón *Taq* ADN polimerasa 10X empleado estaba compuesto por: 100 mM de Tris-HCl (pH 9), 500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂ y 1% Triton X-100. La disolución de dNTPs contiene 5 mM de cada uno de los desoxinucleótidos.

Las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de amplificación se describen en la tabla 10.

En el proceso de subclonaje de fragmento de ADN se hizo necesaria una mayor fidelidad de copia, por ello la polimerasa empleada fue la *Pfu* ADN polimerasa (Promega, EEUU). Esta enzima posee actividad correctora, es decir, actividad exonucleasa 3'-5', lo que aumenta en seis veces la fidelidad en la síntesis de ADN en comparación con la *Taq* polimerasa. Esta enzima es menos eficiente que la *Taq* polimerasa, por ello se usan tiempos de elongación de 2 min por kpb. Al contrario de lo que sucede con la *Taq* polimerasa la *Pfu* no incorpora dATPs terminales dando lugar a productos romos. El tampón de reacción de la *Pfu* 10X presenta la siguiente composición: 200 mM de Tris-HCl (pH 8), 100 mM de KCl, 100 mM de (NH₄)₂SO₄, 20 mM de MgSO₄, 1% de Triton X-100 y 1 mg/ml de BSA.

Tabla 11. Condiciones para la amplificación de ADN por PCR.

Temperatura	Tiempo	
94°C	2-5 min	
94°C	30-45 s	30-35 ciclos
T _a ¹	30 s	
72°C	tiempo de extensión ²	
72°C	5-7 min	

¹T_a, temperatura de anillamiento, generalmente 5°C por debajo de la T_m de los cebadores.

², se estableció 1 min por kpb de ADN a amplificar como tiempo de extensión.

5.5.2. PCR de colonias de bacterias y levaduras.

En ocasiones fue de gran utilidad el poder amplificar secuencias de ADN sin necesidad de una purificación previa del mismo; sobre todo cuando se pretendía identificar la existencia de algún fragmento de interés. Tanto para la PCR de colonias de bacterias como de levaduras se empleó el protocolo descrito en el apartado anterior con modificaciones en el molde.

Para PCR de colonias de bacterias inicialmente se resuspendió la colonia en 8 µl de agua estéril con ayuda de una micropipeta. De ellos, 4 µl se usaron como molde para la PCR, mientras que los 4 µl restantes se utilizaron para crecer las bacterias en caso de que portaran el vector de interés. Mediante este protocolo se consiguieron amplificar fragmentos de hasta 4 kpb de tamaño.

Para la PCR de colonias de levaduras se resuspendió una colonia en 8 µl de agua estéril con ayuda de una micropipeta. La suspensión de levaduras se calentó en el microondas durante 3 min a 600 W de potencia o a 95°C durante 5 min en el termociclador y se enfrió sobre hielo. Luego se le añadió la mezcla de reacción para la PCR. La amplificación a partir de este molde no permitió obtener fragmentos superiores a 1.5 kpb.

5.6. Análisis y modificación del ADN.

5.6.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción persiguió varios objetivos: caracterizar, identificar, construir nuevas moléculas de ADN o linearizar plásmidos integrativos de levadura. Las digestiones se realizaron siguiendo las

recomendaciones del fabricante (temperatura y tampón de la reacción). Se utilizaron de 5 a 10 U de enzima por cada μg de ADN en un volumen de 20-100 μl . La digestión conjunta con varias enzimas se realizó en el tampón en el que presentaban ambas las mejores actividades o se usó el tampón OPA (“One-Phor-All”) en la dilución adecuada para cada enzima.

OPA 10X

Tris-acetato 100 mM pH 7.5

Acetato magnésico 100 mM

Acetato potásico 500 mM

5.6.2. Electroforesis de ADN.

La electroforesis en geles de agarosa se usó para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN.

La separación de ácidos nucleicos con un tamaño comprendido entre 0.3 y 30 kpb se realizó en geles de agarosa sumergidos en tampón TAE 1X. Los geles se prepararon en dicho tampón a la concentración adecuada de agarosa (0.7-2%) según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 12). Para ello se funde la agarosa calentándola en el microondas y luego se deja enfriar a temperatura ambiente para permitir su gelificación. En cada uno de los pocillos se cargó un volumen de muestra entre 5-20 μl preparada con tampón de carga y la electroforesis se realizó con una diferencia de potencial constante entre 75 y 140 V en función de la cubeta utilizada.

El avance de la electroforesis en el gel se visualiza por los colorantes del tampón de carga: el azul de bromofenol y el verde de xilén cianol. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos en una solución acuosa de bromuro de etidio preparada a 0.5 mg/ml y para la visualización de los resultados, los geles se expusieron a luz ultravioleta de 302 nm en un transiluminador ECX-15 (Vilbert Lourmat, Francia). Se fotografiaron empleando el equipo de documentación Documentation System (UVP, Inglaterra) y el ChemiDocTM XRS+ (BioRad, EEUU). El tamaño de los fragmentos de ADN fue estimado en función de los patrones moleculares de tamaño conocido.

Tampón TAE 50X	Tampón de carga 10 X
Tris 2M	Glicerol 50% (v/v)
Ácido acético glacial 5.7% (v/v), pH 8	EDTA 1 mM
EDTA 50 mM	Azul de bromofenol 0.25% (p/v)
	Verde de xilén cianol 0.25% (p/v)

Tabla 12. Concentración de agarosa apropiada para separar fragmentos de ADN.

Agarosa (%)	Fragmento de ADN (kpb)
0.5	30-1
0.7	12-0.8
1.0	10-0.5
1.2	7-0.4
1.5	3-0.2

5.6.3. Construcción de moléculas de ADN recombinante.

Para la construcción de todos los vectores usados en este trabajo se siguió el protocolo indicado a continuación:

i. El vector e inserto se digirieron con las endonucleasas de restricción adecuadas. La completa digestión de los mismos se comprobó mediante electroforesis y se extrajeron los fragmentos del gel de agarosa para minimizar la contaminación por fragmentos no deseados o plásmidos sin digerir. Este procedimiento se usó en todos los casos salvo cuando se trabajó con el vector comercial pGEM-T *Easy* (Promega, EEUU) que ya estaba digerido para su uso.

ii. Una vez cuantificado el vector y el inserto se realizó un primer control para comprobar la ausencia de vector sin cortar. Para ello se transformó *E. coli* con 50-100 ng de vector.

iii. Tras comprobar la ausencia de fondo circular, en caso de que fuera necesario se trató el vector y el inserto para permitir su ligación (incompatibilidad de las dianas usadas para linarizar el vector y el inserto). En tal situación, el vector o el inserto o ambos, se sometieron a reacciones de relleno de sus extremos y desfosforilación del vector. Siempre que llevamos a cabo reacciones de desfosforilación del vector, realizamos un control para comprobar la imposibilidad de autoligación de este fragmento de ADN, demostrando que la reacción de desfosforilación había funcionado correctamente. Para ello el vector fue objeto de una reacción de ligamiento sin inserto.

iv. Tras este segundo control continuamos con el ligamiento si el número de colonias no era superior a 5. En caso contrario repetimos los pasos anteriores. Una vez obtenido un vector receptor adecuadamente desfosforilado realizamos la reacción de ligamiento con el inserto en las condiciones adecuadas en cada caso. A continuación se transformó con la mezcla de reacción bacterias competentes.

v. La búsqueda de los transformantes que tuvieran la construcción recombinante diseñada se realizó por dos estrategias en función del tamaño y la disponibilidad de cebadores adecuados: 1), por PCR de colonia de bacteria, siempre y cuando los fragmentos a amplificar no fueran superiores a 4 kpb; o 2), por “mini-preps” a partir de colonia para fragmentos de mayor tamaño. En cualquier caso, habitualmente no fue necesario analizar más de 10 colonias.

vi. Una vez extraído el plásmido diseñado lo analizamos mediante una nueva PCR o por digestión con al menos 2 enzimas de restricción. Cuando se estimó necesario se secuenció parcialmente para mejorar la fiabilidad.

5.6.3.1. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

En determinadas ocasiones fue necesario aislar los fragmentos de ADN digeridos con endonucleasas de restricción de los geles de agarosa. Para ello una vez separados por electroforesis e identificados por tinción con bromuro de etidio, la banda de interés fue retirada del gel con ayuda de un bisturí estéril. A continuación se usó el Kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Alemania). Este método se basa en la disgregación de la agarosa mediante tratamiento a 50°C y la posterior adsorción del ADN a una matriz de la cual se liberara mediante la adición de agua.

5.6.3.2. Relleno de extremos 3' no protuberantes.

Para determinados ligamientos fue necesario rellenar los extremos 3' no protuberantes de una molécula de ADN. Con este fin se usó la actividad polimerasa del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega, EEUU) en presencia de dNTPs en las concentraciones adecuadas. El volumen máximo de esta reacción fue de 20 µl, utilizando un máximo de 10 µl de muestra.

La mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima calentándola a 75°C durante 10 min.

Tampón Klenow 10X

Tris-HCl 500 mM pH 7.2

MgSO₄ 100 mM

DTT 1mM

Reacción de relleno con <i>Klenow</i>	
ADN	1-4 µg
Tampón de reacción Klenow	1X
dNTPs	40 µg
Fragmento Klenow	1 U/µg de ADN
BSA	20 µg/ml
H ₂ O	Hasta 20 µl

5.6.3.3. Desfosforilación de los extremos 5' de moléculas de ADN.

Este procedimiento permite eliminar grupos fosfato de los extremos 5' de vectores linearizados impidiendo su recircularización en ligamientos posteriores. Normalmente tras la digestión del plásmido y en ocasiones tras el relleno de sus extremos fue necesario retirar los grupos fosfato. Para esto se usó la enzima fosfatasa alcalina de camaron (*Pandalus boreales*) (Roche, Alemania) que presentaba la ventaja de inactivarse por calor. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl en las siguientes condiciones:

- Para extremos 5' fosforilados protuberantes: 1 unidad de fosfatasa por cada pmol de extremos fosforilados. La mezcla se incubó a 37°C, 10 min.
- Para extremos 5' fosforilados romos, por cada 0.2 pmoles de extremos fosforilados se incubaron con 1 U de fosfatasa durante 60 min a 37°C.

Una vez finalizada la reacción se inactivó la enzima por calor a 65°C durante 15 min.

La composición del tampón de desfosforilación 10X fue: 0.5 M Tris-HCl pH 8.5, y 50 mM MgCl₂.

5.6.3.4. Adición de desoxiadenosinas a extremos 3' romos de moléculas de ADN.

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 ADN de extremos romos, fundamentalmente productos de PCR amplificados con *Pfu* polimerasa, ya que carece de la actividad transferasa terminal. El clonaje de estos productos en el vector pGEM-T *Easy* requiere de la adición de desoxiadenosinas (dATPs) a los extremos 3', para lo cual se utilizó la actividad transferasa terminal de la *Taq* polimerasa. Para llevar a cabo esta reacción se siguieron las recomendaciones del fabricante, usando 2-5 μ l de producto de PCR purificado previamente (purificado con el Kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Alemania)) en un volumen total de 10 μ l. Para que la adición de desoxiadenosinas ocurra se necesita incubar la mezcla a 70°C durante 30 min.

Adición de desoxiadenosinas	
Producto de PCR purificado	2-5 μ l
Tampón Taq polimerasa	1X
dATPs	0.2 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Taq polimerasa	5 U
H ₂ O	Hasta 10 μ l

5.6.3.5. Reacción de ligamiento de moléculas de ADN.

Una vez preparados correctamente el vector e inserto se realizó la reacción de ligamiento. Para ello utilizamos de manera rutinaria la ADN ligasa del fago T4 (Roche, Alemania) en un volumen máximo de reacción de 10 μ l. La mezcla se preparó colocando de 50-100 ng de vector y la concentración de inserto para conseguir una relación 1:3 molar vector/inserto. Se añadió el tampón de la ligasa al 1X (66 mM de Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 mM de ATP), 1 U de ligasa y se ajustó el volumen con agua MilliQ. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4°C, tanto para el ligamiento de extremos romos como cohesivos.

5.6.3.6. Rastreo de los transformantes.

El rastreo de los transformantes se realizó habitualmente por PCR de colonia, salvo para aquellas construcciones para las que no se disponía de cebadores adecuados. En este caso se recurrió a la extracción rápida de ADN plasmídico y a su identificación mediante electroforesis. El uso de la PCR de colonia permitió un rastreo mucho más rápido. El procedimiento seguido fue el de resuspender la colonia en 8 μ l de agua bidestilada estéril, utilizando 4 μ l para la PCR de colonia. El resto del volumen se reservó hasta identificar alguna construcción positiva para el ligamiento, momento en el cual se sembraron 2 μ l en medio sólido con los antibióticos adecuados y el resto en 5 ml de LB más antibióticos para la extracción del plásmido. Normalmente no fue necesario analizar más de 10 colonias.

5.6.4. Secuenciación de ADN.

Cuando fue necesaria la secuenciación de las moléculas de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de La Laguna, mediante el sistema de secuenciación de Megabace DNA Analysis System (Amersham, Reino Unido).

5.7. Cuantificación génica mediante PCR a tiempo real.

La técnica de PCR a tiempo real se aplicó para la cuantificación de los niveles de ARNm de distintos genes, permitiendo la estimación de la expresión génica relativa.

5.7.1. Extracción de ARN de levaduras.

La extracción del ARN se realizó mediante el kit comercial RNeasy Mini Kit (Quiagen, Alemania). Este kit se basa en la utilización de una resina de intercambio iónico inmovilizada en una columna que en las condiciones adecuadas retienen selectivamente el ARN. Este procedimiento permite obtener cadenas de ARN mayores de 200 nucleótidos de manera rápida y sencilla.

Se siguió el protocolo descrito en el kit con algunas modificaciones. Partimos de 100 mg de células que se rompieron mediante agitación vigorosa con bolas de vidrio en vórtex durante 3 min intercalando 1 min en hielo por cada min de agitación. Las células se resuspendieron en el tampón de rotura proporcionado por el Kit, el cual contiene isotiocianato de guanidina utilizado para la inactivación de las RNAasas. Tras la rotura, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 8 min a 4863 x g. El

Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf y sometido a una nueva centrifugación durante 1 min a 10060 x g en este caso a temperatura ambiente. La adición al sobrenadante de un volumen de etanol al 70% (v/v) ayudó a proporcionar las condiciones apropiadas para la unión del ARN a la matriz de sílica gel. Una vez que la muestra fue aplicada a la columna se procedió a los lavados repetidos con un tampón de alta concentración salina que permitió eliminar los contaminantes, mientras el ARN permanecía unido a la columna. Finalmente el ARN fue eluido en agua libre de ARNasas. El ARN obtenido se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm y aplicando la fórmula: concentración ARN ($\mu\text{g/ml}$)= absorbancia (260 nm) \cdot 40 \cdot factor de dilución en la medida. Siguiendo este protocolo se obtuvieron cantidades de ARN que oscilaban entre los 50 y los 100 μg . También se comprobó su pureza, indicada por el cociente de la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm, que siempre se mantuvo entre los valores óptimos de 1.9 a 2.1.

Las moléculas de ADN que podían estar contaminando el ARN aislado fueron eliminadas mediante el tratamiento con ADNasa (RNase- Free-DNase Set, Qiagen, Alemania) durante 10 min a temperatura ambiente. Las ADNasas fueron inactivadas con 20 mM de EDTA.

5.7.2. Síntesis del ADNc.

La obtención del ADNc (ADN complementario) se realizó empleando el kit comercial iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como molde de la reacción se utilizó 1 μg de ARN obtenido como indicamos en el paso anterior. La retrotranscriptasa usada es una enzima modificada que permite la síntesis de ADNc en un amplio rango de concentraciones de ARN además de estar mezclada con inhibidores de ARNasa. La mezcla de reacción contenía una mezcla de oligos dT y random. Éstos últimos son cebadores con un tamaño de unos 6 nucleótidos y de secuencia seleccionada al azar. Se utilizaron 50-100 U de enzima en un volumen máximo de reacción de 20 μl . Las condiciones de la reacción fueron: 1°) 5 min a 25°C, 2°) 30 min a 42°C y 3°) 5 min a 85°C.

5.7.3. Cuantificación relativa de la expresión génica mediante PCR a tiempo real.

Esta técnica se basa en la detección y cuantificación de la aparición de un producto de PCR específico. Para ello se utiliza algún método de generación de

fluorescencia que permita seguir el desarrollo de la reacción. La aplicación de esta técnica sobre muestras de ADNc y con oligos que amplifiquen específicamente una secuencia de ADN del gen de interés permite cuantificar los niveles de expresión de dicho gen en múltiples condiciones. Cuanto mayor sea la transcripción del gen, mayor será la cantidad de ARNm del mismo y por tanto mayor su presencia en el ADNc. Esta situación produciría un rápido aumento de la aparición e incremento de la fluorescencia que superaría antes el umbral establecido previamente. El valor que nos permite realizar esta cuantificación es el denominado C_T (Threshold Cycle). Se denomina como el ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia cruza la línea umbral indicando la detección del producto de PCR acumulado. En este punto la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo una relación lineal entre el logaritmo del cambio de fluorescencia y el número de ciclos.

En este trabajo utilizamos como método de generación de fluorescencia el agente intercalante SYBR Green®. Este método es muy versátil porque puede utilizarse en la amplificación de cualquier producto debido a sus capacidad de intercalarse en cualquier molécula de ADN bicatenario. Sin embargo, esto también supone su principal inconveniente ya que también genera fluorescencia de productos inespecíficos por lo que es necesaria una gran optimización de la técnica. Para preparar las reacciones de PCR se utilizó el kit comercial FastStart SYBR Green Master (Roche, Alemania) que proporciona una mezcla conteniendo todos los elementos necesarios para llevar a cabo la PCR (SYBR Green®, $MgCl_2$, hot start *Taq*, etc.) excepto los cebadores específicos y el ADNc. 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 ADNc en un volumen total de 20 μ l.

Se utilizaron diluciones seriadas de ADNc de cada muestra pues resultan muy útiles a la hora de verificar la fiabilidad de los datos 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 [229]. 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 ADNc de cada muestra. La dilución 1/5 se llevó a cabo diluyendo 5 µl del ADNc en 25 µl totales (disolvente agua). De estos 25 µl se tomaron 5 µl y se trasvasaron a otro tubo que contenía 20 µl de agua (dilución 1/25), y así sucesivamente hasta obtener las 4 diluciones.

Dentro de los diferentes métodos de cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real utilizamos la cuantificación relativa. Este método se basa en la expresión relativa del gen diana respecto a un gen de referencia cuyos valores de expresión no cambian en las condiciones experimentales. En este caso utilizamos el gen de la actina. Aplicamos además el método de Pfaffl [230], que tiene en cuenta la eficiencia de la amplificación de ambos genes. El cambio de expresión se obtiene aplicando la fórmula:

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

Donde:

- E_{diana} : Eficiencia de la amplificación del gen diana.
- $E_{\text{referencia}}$: Eficiencia de la amplificación del gen de referencia (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.
- $\Delta C_T \text{ referencia}$: 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 *SSU2* en dos condiciones diferentes, amonio y nitrato. En este caso, *SSU2* estaría representado por el amplicón X, *SSU2* en nitrato sería la condición problema y *SSU2* en amonio sería la condición control.

La eficiencia de la amplificación se calcula utilizando el valor de la pendiente obtenida en la curva estándar en la que se representan los datos obtenidos de C_T para cada dilución del ADNc respecto a la dilución correspondiente; de manera que:

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

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.

Los oligos utilizados se obtuvieron mediante la aplicación informática Primer3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/Primer3_www.cgi). Estos oligos tenían un tamaño de 15-20 nucleótidos y un porcentaje de G/C inferior al 70%. Se usaron a una concentración de 0.5 μ M. La reacción se llevó a cabo en el iCycler iQ (Bio-Rad, EEUU) con el siguiente protocolo:

Desnaturalización	2 min	95°C	1 ciclo
Amplificación y cuantificación	15 s 20 s 20 s	95°C 60°C 72°C	40 ciclos
Fusión (Melting)	$\Delta 0.5^\circ\text{C/s}$	60°C-90°C	

El producto final de la reacción genera una “curva de fusión o de melting” donde se representa la fluorescencia en función de la temperatura para poder detectar la posible existencia de productos inespecíficos, ya que cada fragmento tiene unos picos característicos. Los resultados fueron analizados mediante el programa iCycler (Bio-Rad, EEUU), junto con la aplicación de los cálculos matemáticos indicados anteriormente.

6. Estadística y presentación de resultados.

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los resultados de actividades enzimáticas así como velocidades de consumo de nitrato y de nitrito se representan como el valor medio de los datos de los distintos experimentos con el error estándar. Inmunoblot, experimentos de localización celular y consumo de rubidio se realizaron por triplicado y sólo se aceptaron cuando no se observaban diferencias significativas en los resultados.

7. Metodología específica desarrollada en este trabajo. Vectores desarrollados.

7.1. Obtención de extractos de proteínas totales mediante tratamiento alcalino.

En algunos casos sustituimos el método de extracción descrito anteriormente por este otro método de extracción de proteínas para SDS-PAGE, el cual resulta mucho más rápido y fácil de desarrollar. Este método se basa en la acción combinada del NaOH y del β -mercaptoetanol (éste último presente en el tampón de desnaturalización) para producir la extracción de proteínas [159, 192]. Se usó principalmente para la búsqueda de nuevas cepas de levaduras que habían sido transformadas con construcciones portadoras de etiquetas como HA y GFP, las cuales pueden ser determinadas mediante western blot con el empleo de los anticuerpos adecuados. En todos los casos en los que se empleó esta técnica, se partió de una masa celular extraída de la placa de cultivo con un palillo, la cual fue resuspendida en 100 μ l de agua MilliQ. Sin embargo, también se puede partir de 2-3 mg (peso fresco) directamente del medio de cultivo. Una vez que tenemos las células resuspendidas en el agua MilliQ, se le añade el mismo volumen de una disolución de NaOH al 0,2 N y se deja a temperatura ambiente durante 10 min. Estos dos pasos de resuspensión (primero en agua y luego en NaOH) son esenciales para una correcta extracción de proteínas. Seguidamente se elimina el sobrenadante por centrifugación a 10.508 x g durante 2 min, se resuspende el pellet en 40 μ l de tampón de desnaturalización al 1X y se hierve durante 5 min. Estas muestras se pueden usar directamente o almacenan a -20°C hasta su uso.

7.2. Determinación de nitrato y nitrito intracelular en extractos etanólicos libres de células.

Este método permite la obtención de extractos libres de células aptos para la determinación de diferentes metabolitos, usando un buffer con 75% de etanol [111]. Para ello, partimos de cultivos celulares crecidos en YGNH hasta una DO_{660} 2.7 que luego se incuban en medios con 1 mM de nitrato o de nitrito a una concentración celular de 10 mg/ml, tras ser ayunados durante 120 min en ausencia de fuentes nitrogenadas. Se recogen muestras a distintos tiempos de 200 mg de células. Las células son lavadas dos veces con agua fría para parar el metabolismo y congeladas a -20°C hasta el momento de su manipulación. Para la obtención de estos extractos, las células son descongeladas en hielo, resuspendidas en 1 ml de tampón de extracción (75% etanol + 70 mM HEPES

a pH 7.5) e incubadas a 80°C durante 5 min para romper las células. Posteriormente son centrifugadas a 20500 x g durante 15 min, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo eppendorf y se elimina el etanol en un concentrador (DNA-Plus System, Heto-Holten, Alemania) para eliminar el etanol. Cuando el volumen sea de aproximadamente 500 µl se le añade agua hasta que el volumen alcance 1 ml y se vuelven a concentrar hasta que el volumen final se haya reducido a la mitad, y por último se centrifugan en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante obtenido se puede congelar a -20°C o medir directamente el nitrato y el nitrito en placas multipocillos, como ya se explicó en el apartado 3.9 y 3.10 de material y métodos.

7.3. Expresión de *SSU2* en ovocitos de *Xenopus laevis*.

7.3.1. Síntesis de ARNc.

Para expresar *SSU2* en ovocitos de *Xenopus laevis*, en primer lugar, se clonó un fragmento de unos 1200 pb que contenía la pauta abierta de lectura del gen *SSU2* fusionada a la proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) para determinar si la proteína Ssu2 se expresaba en este sistema heterólogo. En segundo lugar, se clonó esta construcción (Ssu2-YFP) en el plásmido pGEMHE [166]. Este plásmido contiene regiones 5' y 3' que no se transcriben (UTRs) del gen de la β-globina de *X. laevis* flanqueando el polylinker, que aumentan la expresión de proteínas en este sistema. La construcción del vector pXeSSU2YFP fue necesaria para sintetizar el ARNc que será inyectado en los ovocitos. Para ello se usó el kit mMESSAGING mMACHINE (Ambion, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante, empleando 1 µg de plásmido linearizado. Este kit contiene un análogo de la 7-metil guanósina que le aportará la “caperuza” en el extremo 5' del ARNm, necesario para la correcta traducción del ARN. La reacción se incubó durante 2 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó el tratamiento con ADNasa para eliminar la posible contaminación por ADN. Se usó la TURBO DNase (Ambion, Austin). Seguidamente se purificó el ARNc (ARN complementario) mediante el kit Ambion's MEGAclean (Ambion, EEUU) y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm. El ARNc se almacenó hasta su uso a -80°C.

7.3.2. Extracción y desfoliculación de los ovocitos.

La extracción de ovocitos se realizó a partir de hembras adultas de *Xenopus* previamente anesteciadas por inmersión en una solución 6.5 mM de benzocaina (Fluka, Sigma) tamponada a pH 7.2-7.3. La ovariectomía parcial se realizó mediante una pequeña insición en el abdomen de aproximadamente 5-9 mm, de forma que los lóbulos de los ovarios se pudieran exponer lo suficiente como para recolectar los ovocitos sin dañarlos. Los ovocitos que se extrajeron se colocaron en una placa de Petri con tampón Ringer sin calcio (en mM: 82.5 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 Na₂HPO₄ and 10 HEPES, a pH 7.5). Una vez terminada la extracción, se devolvieron los ovarios al interior y se suturó la herida de la rana. Para eliminar las células foliculares que cubren a los ovocitos, se sometieron a un tratamiento con colagenasa AI (2 mg/ml) durante 1.5-2 h con agitación leve. Tras este tiempo de incubación, los ovocitos se lavaron varias veces con buffer sin calcio para terminar lavándolos con buffer con calcio.



Figura 94. Ejemplar de *Xenopus laevis* a la izquierda. Ovocito de *Xenopus* en fase V-VI con un diámetro entre 1.2- 1.5 mm, visto con un microscopio estereoscópico (a la derecha de la imagen)

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y unas pinzas se seleccionaron aquellos que estaban en fase V o VI y se colocaron en una nueva placa de Petri con buffer con calcio. Se mantuvieron entre 17-18°C durante los días que duraron los experimentos.

7.3.3. Microinyección de ARNc.

Para inyectar los ovocitos con el ARNc de *SSU2* se utilizó un microinyector electrónico Drummond (Drummond Scientific Company, EEUU) acoplado a un micromanipulador Nanoject II. Se fabricaron puntas largas y finas a partir de capilares de boro-silicato usando un estirador de pipetas (modelo P-97, Sutter Instrument Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

Company, EEUU). Se inyectaron entre 15-20 ovocitos para cada concentración de ARNc empleada. Como control se usaron lotes de ovocitos a los que se les inyectó agua o a los que se dejaron intactos. Después de la inyección los ovocitos se incubaron a 18°C durante 7 días.

7.3.4. Selección de los ovocitos que expresan Ssu2-YFP.

La selección de los ovocitos que expresaban Ssu2-YFP se llevó a cabo mediante inmunoblot de extractos de ovocitos usando un anticuerpo monoclonal contra GFP (Roche, Alemania) y mediante microscopía de fluorescencia. La extracción de proteínas de los ovocitos se realizó mediante la rotura de los mismos (se usaron de 3-5 ovocitos para cada extracción) en un tampón compuesto por: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (Roche, Alemania) al 1X). Se rompieron mediante pipeteo y se incubaron 10 min en hielo, con agitación ocasional. Posteriormente se clarificó el sobrenadante por centrifugación a 10508 x g a 4°C durante 10 min, se le añadió un volumen de tampón de desnaturalización al 4X y se incubaron a 40 °C durante 30 min.

La visualización de Ssu2-YFP en la superficie de los ovocitos se hizo empleando un microscopio láser confocal (Olympus FluoView™ 1000, Olympus, Alemania). Como control negativo de expresión se usaron ovocitos sin inyectar.

7.3.5. Determinación del nitrato y del nitrito en los ovocitos.

La capacidad de Ssu2 de excretar nitrato y / o nitrito en este sistema heterólogo se midió en el medio de incubación, para lo cual se inyectaron tanto ovocitos expresando Ssu2 como ovocitos que no expresaban esta proteína, con 30 µM de KNO₃ or 30 µM NaNO₂. Se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente tras lo cual se retiraron los ovocitos. El nitrato y el nitrito del medio se determinaron clorimétricamente como se describe en el apartado 5.3.10 y 5.3.11 de materiales y métodos.

7.4. Vectores construidos en este trabajo.

7.4.1. Interrupciones génicas.

Para estudiar la posible participación de nuevos genes en la vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha*, una primera aproximación fue la interrupción de los genes

candidatos. En todos los casos se siguió la misma estrategia. El primer paso fue la búsqueda de pautas abiertas de lectura en el genoma de esta levadura que codificaran para proteínas con alta similitud a la proteína caracterizada en *S. cerevisiae*, en otras levaduras, hongos o plantas. La estrategia utilizada se esquematiza en la figura 95.

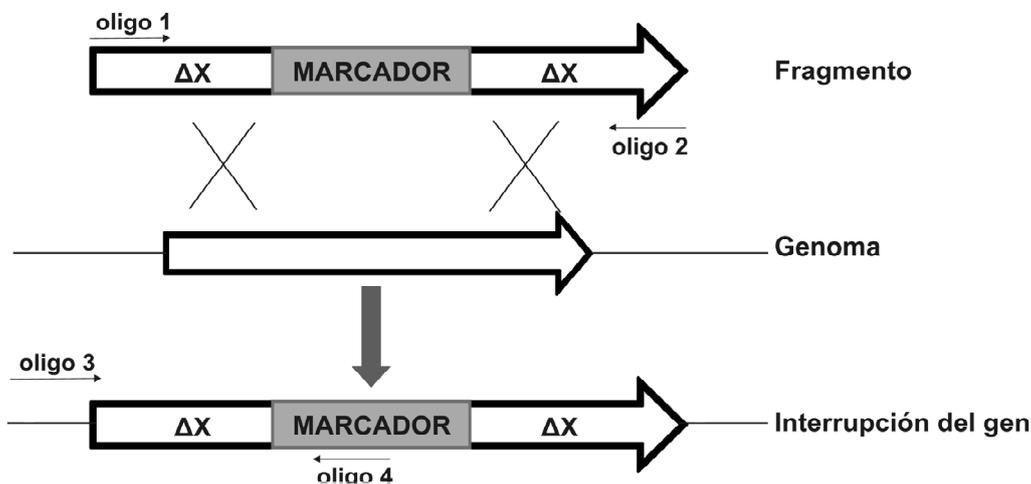


Figura 95. Estrategia de interrupción génica. En todos los casos la interrupción génica se realizó por reemplazamiento de la copia funcional del gen por una delecionada y que incorporaba un marcador auxotrófico [112].

Todos los vectores empleados en este trabajo se recogen en el Apéndice II.

7.4.1.1. Interrupción de *SSU1*.

7.4.1.1.1. Plásmido para la interrupción.

Para la interrupción del gen *SSU1* fue necesaria la construcción de un plásmido en el que se delecionaba la mayor parte de la región codificante de este gen y se sustituía por el gen marcador *URA3*.

En un primer paso fue necesario amplificar un fragmento de ADN del genoma de levadura que contenga la ORF para este gen. Para ello realizamos una PCR con *Pfu* polimerasa usando los oligos *SSU1-F* y *SSU1-R*, que amplifican un fragmento de 2852 pb que incluye la secuencia codificante de este gen y 905 pb y 795 pb de region 5' y 3' no codificante. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T Easy, aprovechando la adición de ATPs terminales por parte de la *Taq* polimerasa. El plásmido resultante, denominado pGEMT-*SSU1* se digirió con las enzimas *Bgl*III y *Xho*I, que permitían delecionar una región de 1642 pb dentro de la ORF. La reacción de ligamiento se realizó tras digerir el plásmido pBSURA3 con *Bam*HI y *Xho*I, las cuales liberan un fragmento de unos 1951 pb que contenía el gen marcador *URA3*. El plásmido resultante

de 6176 pb se denominó p Δ ssu1URA3, donde el gen *SSU1* quedaba interrumpido por el gen *URA3*.

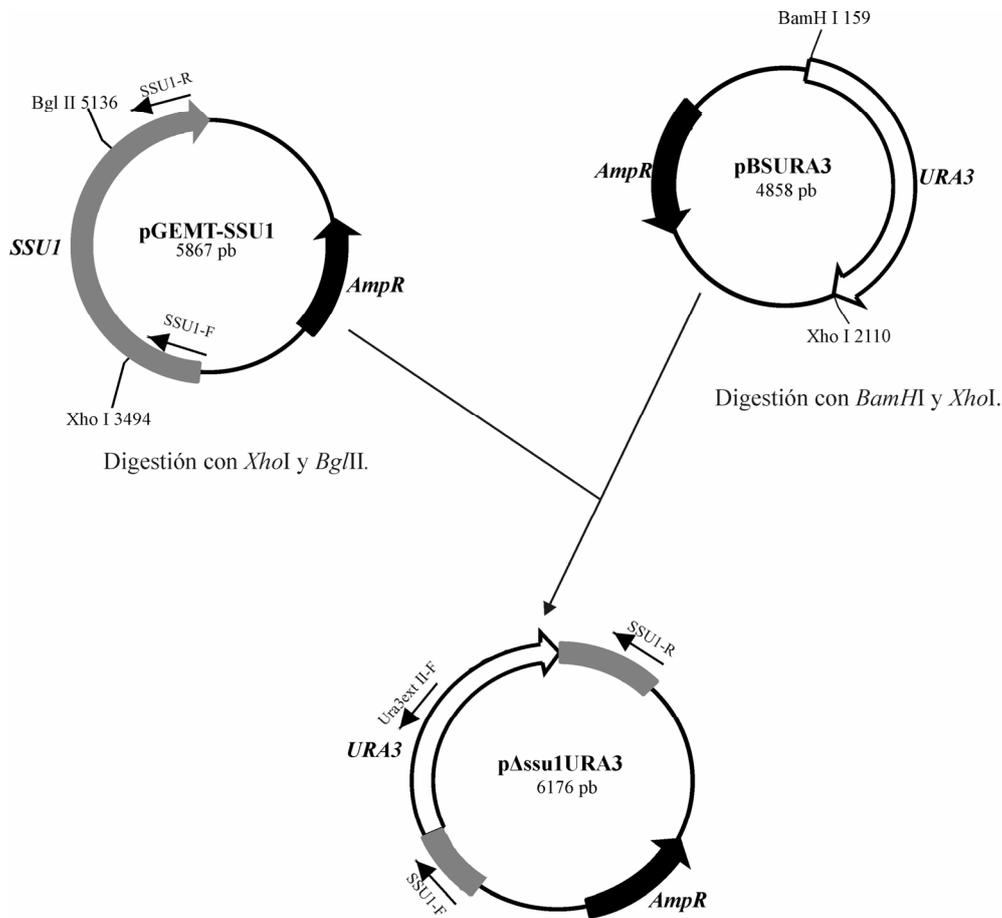


Figura 96. Construcción del plásmido p Δ ssu1URA3. Se deletionó una región central del gen *SSU1* y en esa posición se insertó un fragmento que contenía el gen marcador *URA3*. Esta secuencia con el marcador flanqueado por regiones de *SSU1* se utilizó para la interrupción de este gen.

7.4.1.1.2. Estrategia de interrupción de *SSU1*.

Para la interrupción de este gen se usó la estrategia de reemplazamiento mediante doble recombinación homóloga de la copia genómica y funcional del mismo por una copia deletionada y que incluía el gen marcador *URA3*. Mediante PCR con *Taq* polimerasa y con los oligos SSU1-F y SSU1-R del plásmido p Δ ssu1URA3 se obtuvo un fragmento de 3161 pb en el que el gen *URA3* estaba flanqueado por regiones homólogas a *SSU1* de 483 pb en 5' y de 731 pb en 3'. Con este fragmento se transformó una cepa silvestre *ura3⁻* seleccionándose los transformantes por crecimiento en medio sin uracilo. Se determinó por PCR de colonia los transformantes en los que tuvo lugar el reemplazamiento de la copia genómica por la copia deletionada del gen. Para ello usamos un oligo externo al fragmento de PCR de *SSU1* que se usó para interrumpir

dicho gen, denominado SSU1int-F y otro que hibridaba en el gen marcador *URA3*, Ura3 ext II-F amplificando un fragmento de unas 870 pb. El uso de la PCR de colonia nos permitió hacer una búsqueda masiva de transformantes, pues cada reacción de PCR estaba formada por grupos de 4 colonias diferentes, de forma que con 4 reacciones de PCR se podían analizar 20 colonias. Una vez que obtenemos un grupo que nos da el tamaño esperado, realizamos las PCR pero esta vez por separado, para aislar así, la cepa que tiene el gen interrumpido. Además de comprobar la interrupción por PCR de colonias, los posibles positivos fueron analizados también por PCR, pero esta vez de genómico, con los oligos SSU1int-F y SSU1-R, amplificando un fragmento de 3407 pb siempre y cuando había tenido lugar la doble recombinación homóloga, en caso contrario se observaría una banda de 3098 pb correspondiente al gen nativo. La frecuencia de clones positivos para la interrupción de este gen fue de un 40%. Los transformantes para el rastreo se seleccionan al azar.

7.4.1.2. Interrupción de *SSU2*.

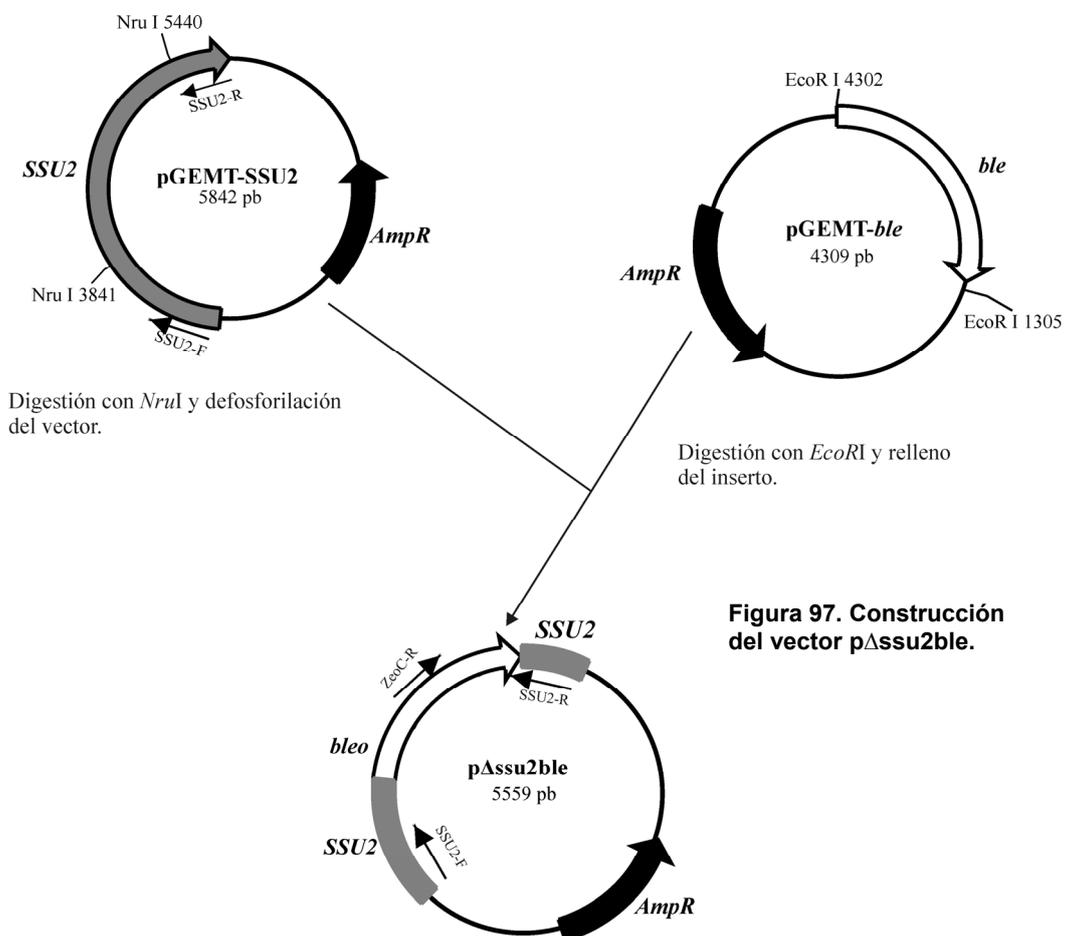
7.4.1.2.1. Plásmido para la interrupción.

La interrupción de *SSU2* se hizo siguiendo la misma estrategia que para el caso de *SSU1*. En primer lugar se clonó en pGEM-T Easy un fragmento de unos 2827 pb, el cual contenía la pauta abierta de lectura del gen *SSU2* más 1008 pb de la región 5' no codificante y 682 pb de la región 3' no codificante. Esta región de 2827 pb fue amplificada por PCR con los oligos SSU2-F y SSU2-R con *Pfu* polimerasa. Así se obtuvo el plásmido pGEMT-SSU2, que fue digerido con *NruI*, liberando un fragmento de 1605 dentro de la ORF de *SSU2*. En esta posición se insertó el gen marcador, que en este caso era el gen *ble*, el cual confiere resistencia al antibiótico zeocina. Este gen se obtuvo por digestión del plásmido pGEMT-ble con *EcoRI* y posterior relleno con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I para que se produzca el ligamiento. La orientación del inserto se comprobó mediante PCR.

7.4.1.2.2. Estrategia de interrupción de *SSU2*.

Se siguió la misma estrategia indicada en el apartado anterior. Mediante PCR con los oligos SSU2-F y SSU2-R y con *Taq* polimerasa se amplificó un fragmento de 2544 pb utilizado para transformar una cepa WT *ura3⁻*. Este fragmento tenía unos brazos complementarios a *SSU2* de 813 pb hacia 5' y de 394 pb hacia 3'. Los

transformantes se seleccionaron en placas de YPD con zeocina. La búsqueda de los transformantes en los que se había llevado a cabo la doble recombinación homóloga se hizo también por PCR de colonias en grupo, pero en este caso con los oligos SSU2 int-R y ZeoC-R, éste último hibrida en el gen marcador *ble* amplificando un fragmento de 802 pb. Los posibles transformantes en los que el gen *SSU2* estaba interrumpido fueron comprobadas por PCR de genómico, esta vez con la pareja de oligos SSU2-F y SSU2 int-R, originando un fragmento de 2887 pb. Si la doble recombinación homóloga no hubiera tenido lugar, el fragmento amplificado sería de 3170 pb. Una vez que pudimos caracterizar la mutación en *SSU2*, la cual causa una drástica sensibilidad a sulfito, aprovechamos este fenotipo para facilitar la búsqueda de otros clones positivos en esta interrupción. Para ello las células transformadas fueron extendidas con ayuda de un palillo estéril en placas de YGAS con y sin 3 mM de sulfito y se incubaron durante 2 días a 37°C. Tras este tiempo, las cepas que no crecían en medios con sulfito pero sí en medios carentes de este compuesto, se convierten en posibles clones con una alta probabilidad de tener el gen *SSU2* interrumpido, hecho que se confirmará por PCR de colonia o de genómico con los oligos citados anteriormente.



7.4.1.3. Interrupción del gen *YNRI* con *KanMX*.

7.4.1.3.1. Plásmido para la interrupción.

La construcción de este plásmido se hizo necesaria para poder interrumpir este gen en una cepa que ya tenía los marcadores auxotróficos ocupados. Partimos del plásmido pNRDURA3, el cual tiene el gen *URA3* flanqueado por regiones del gen *YNRI*. Este vector fue digerido con *Nco*I para liberar el fragmento de *URA3* y en esta posición se clonó el gen *KanMX*, que confiere resistencia a geneticina (G418, Promega). El gen *kanMX* se obtuvo mediante PCR con los oligos *kanMX-F* y *kanMX-R* usando como molde el plásmido pYM18 de *S. cerevisiae* [139] amplificando un fragmento de 1803 pb, que fue el que se usó para interrumpir el gen de la nitrato reductasa.

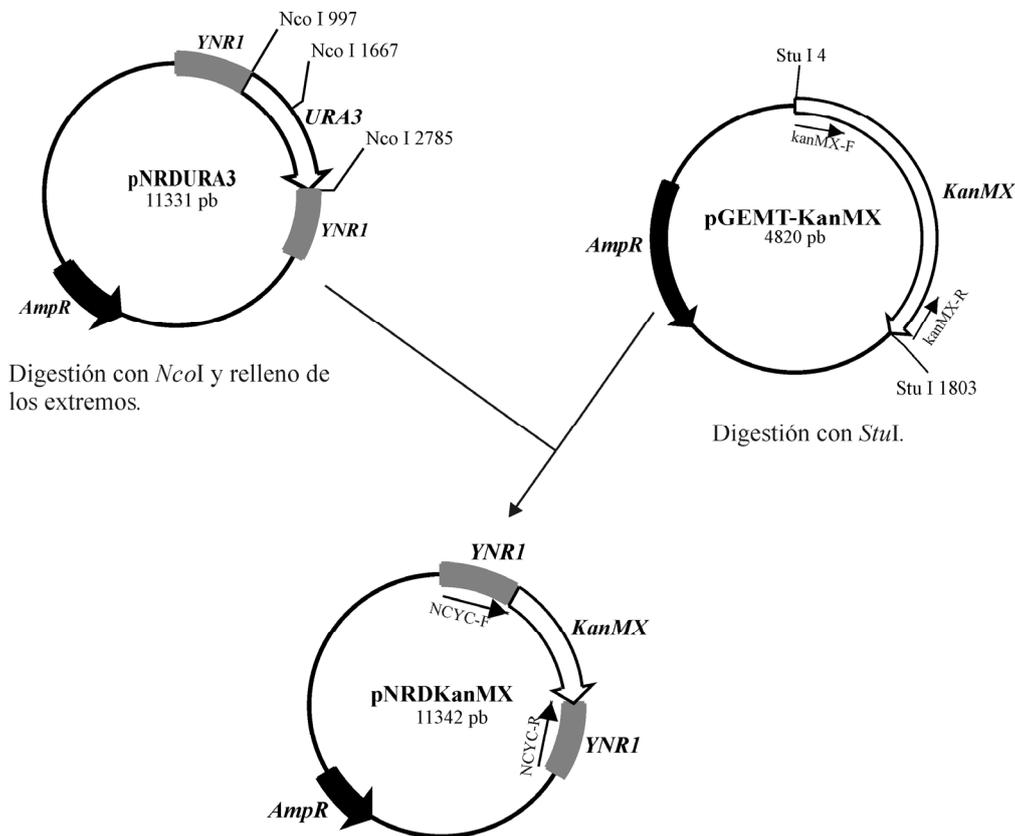


Figura 98. Construcción del vector pNRDKanMX.

7.4.1.3.2. Estrategia de interrupción.

Mediante PCR con los oligos NCYC-F y NCYC-R se amplificó un fragmento de unos 3.5 kpb que fue el que se usó para transformar las cepas de levaduras necesarias. Recordemos que tiene el gen que confiere resistencia a G418 flanqueado por regiones del gen de la nitrato reductasa. En un primer intento, los transformantes se buscaron por su resistencia al antibiótico G418. Sin embargo, no obtuvimos cepas que fueran capaces de crecer en presencia de este antibiótico, debido posiblemente a que el gen *KanMX* posee secuencias promotoras y terminadoras de *S. cerevisiae* que no son funcionales en nuestra levadura. No obstante, decidimos usar otra alternativa para lograr la interrupción de la nitrato reductasa utilizando esta misma construcción, pero esta vez los transformantes fueron seleccionados por su capacidad para crecer en medios con 200 mM de KClO₃. Recordemos que el clorato es un análogo tóxico del nitrato, el cual es transformado a clorito por acción de la nitrato reductasa de forma que tendrán ventaja selectiva aquellas cepas en las que el gen *YNRI* se encuentre interrumpido. La selección de los transformantes también se completó midiendo su capacidad de excreción de nitrito y su actividad nitrato reductasa.

7.4.2. Complementación funcional de *SSU1* y *SSU2*.

Estos plásmidos se construyeron para complementar la mutación tanto de *SSU1* como de *SSU2*, y comprobar como las cepas con estos genes interrumpidos recuperaban el fenotipo silvestre. También nos permitió construir cepas portadoras de varias copias funcionales de *SSU2* y *SSU1*.

Para construir estos vectores partimos de los plásmidos pGEMT-*SSU1* y pGEMT-*SSU2* para extraer la ORF de estos junto con su promotor y terminador. Estos fragmentos conteniendo tanto *SSU1* como *SSU2* fueron clonados en los plásmidos que tienen los marcadores auxotróficos *URA3* y *LEU2*. En el caso de *SSU1* fue introducido en el vector p18B1, el cual contiene el gen *LEU2*; mientras que para el caso de *SSU2*, se usó tanto el plásmido pBSURA3, que contiene el gen *URA3*, como el pGEMT-*LEU2*, que lleva el gen *LEU2*.

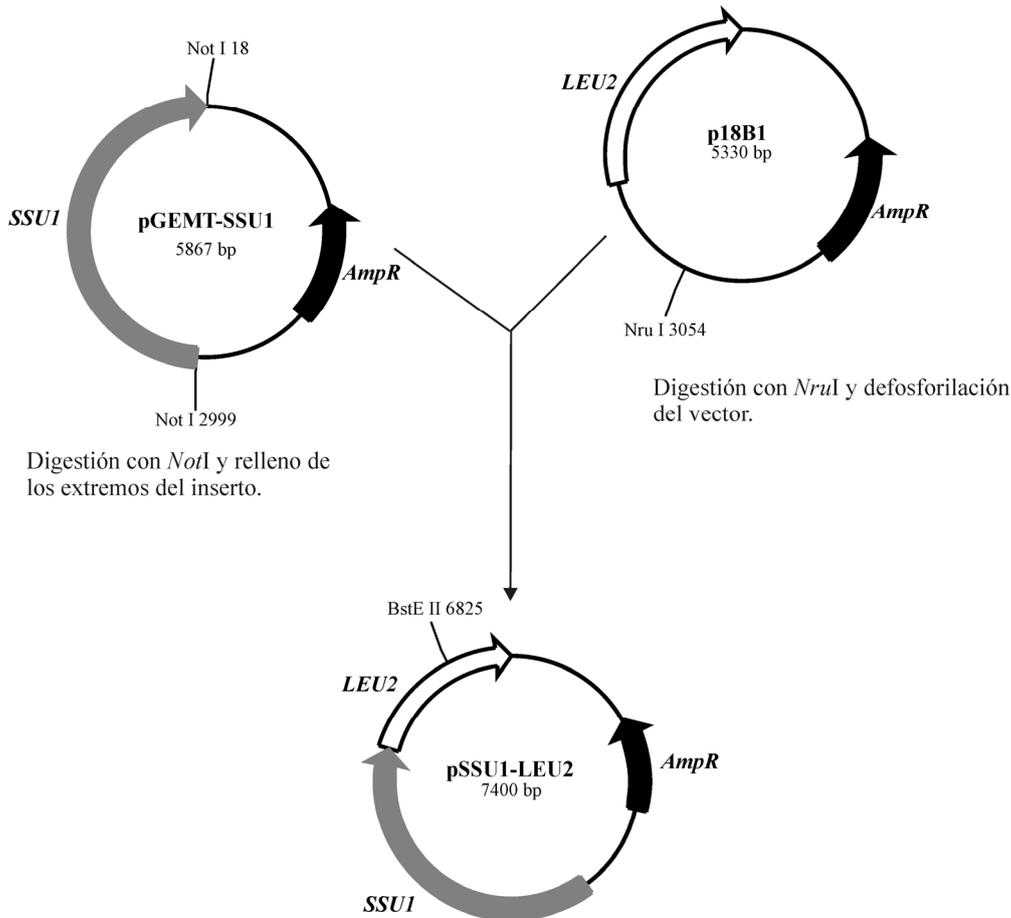


Figura 99. Construcción del plásmido pSSU1-LEU2.

El gen *SSU1* se obtuvo por digestión con *NotI* del vector pGEMT-SSU1 liberándose un fragmento de unas 2886 pb. Este fragmento tras ser rellenado con el fragmento *Klenow* del ADN polimerasa I fue ligado en p18B1, el cual previamente había sido digerido con *NruI* y defosforilado. A continuación se presenta de forma esquematizada la construcción de dicho vector.

La construcción de pSSU2-URA3 se realizó de manera similar. Para la liberación del fragmento de *SSU2* de 2861 pb se digirió el vector pGEMT-SSU2 con *NotI*. Este fragmento se clonó en pBSURA3 tras ser digerido con la misma enzima y ser defosforilado previamente. En cambio, para la construcción del plásmido pSSU2-LEU2, lo que se hizo fue introducir el gen marcador *LEU2* en el plásmido pGEMT-SSU2. Esto se consiguió liberando el gen *LEU2* del vector pGEMT-LEU2 digiriéndolo con *NotI*. Este fragmento de 1525 pb se rellenó antes de montar la reacción de ligamiento con el

vector pGEMT-SSU2 digerido con *NaeI*. A continuación se muestra el esquema de construcción de pSSU2-URA3 a modo de ejemplo.

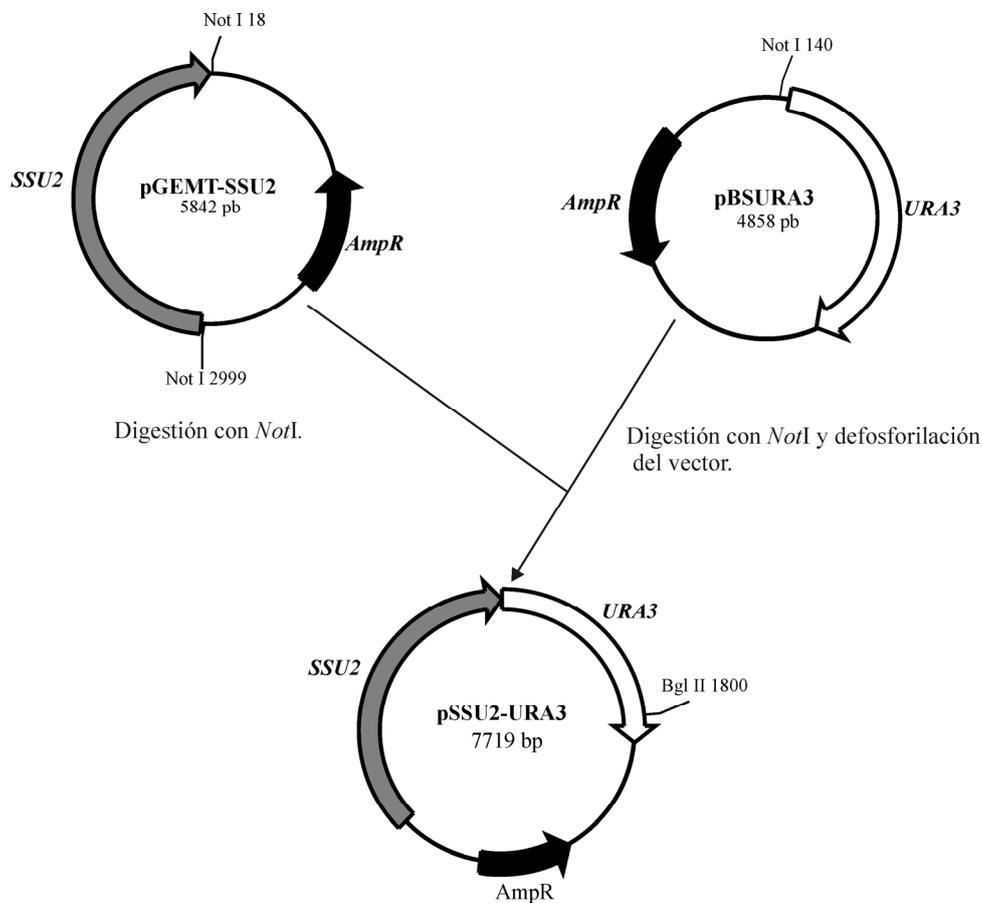


Figura 100. Construcción del vector pSSU2-URA3.

7.4.3. Fusión del promotor de *SSU2* al gen reportero *lacZ*.

7.4.3.1. Construcción del vector pP_{SSU2}-lacZ.

Este plásmido se construyó para estudiar la regulación del gen *SSU2*. Se utilizó el gen reportero *lacZ* (*E. coli*), pues este gen no se encuentra en el genoma de esta levadura y en principio no está sujeto a ningún tipo de regulación por parte de la levadura. Este gen codifica para la enzima β -galactosidasa, la cual es capaz de reaccionar frente a numerosos sustratos cromogénicos, produciendo productos coloreados fácilmente cuantificables.

Para construir este vector se amplificaron 1051 pb de las cuales 1000 pb se corresponden a la región 5' no codificante del gen *SSU2* más 51 pb que codifican 17 aminoácidos de Ssu2, mediante el uso de los oligos SSU2Prom-F y SSU2Prom-R. Este

Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

fragmento fue clonado en pGEM-T Easy, dando lugar al vector pGEMT-P_{SSU2}. Este fragmento fue clonado en fase en el vector pHPI359 [34], el cual contiene el gen *lacZ*, mediante la digestión de ambos vectores con las enzimas *Bam*HI y *Shp*I.

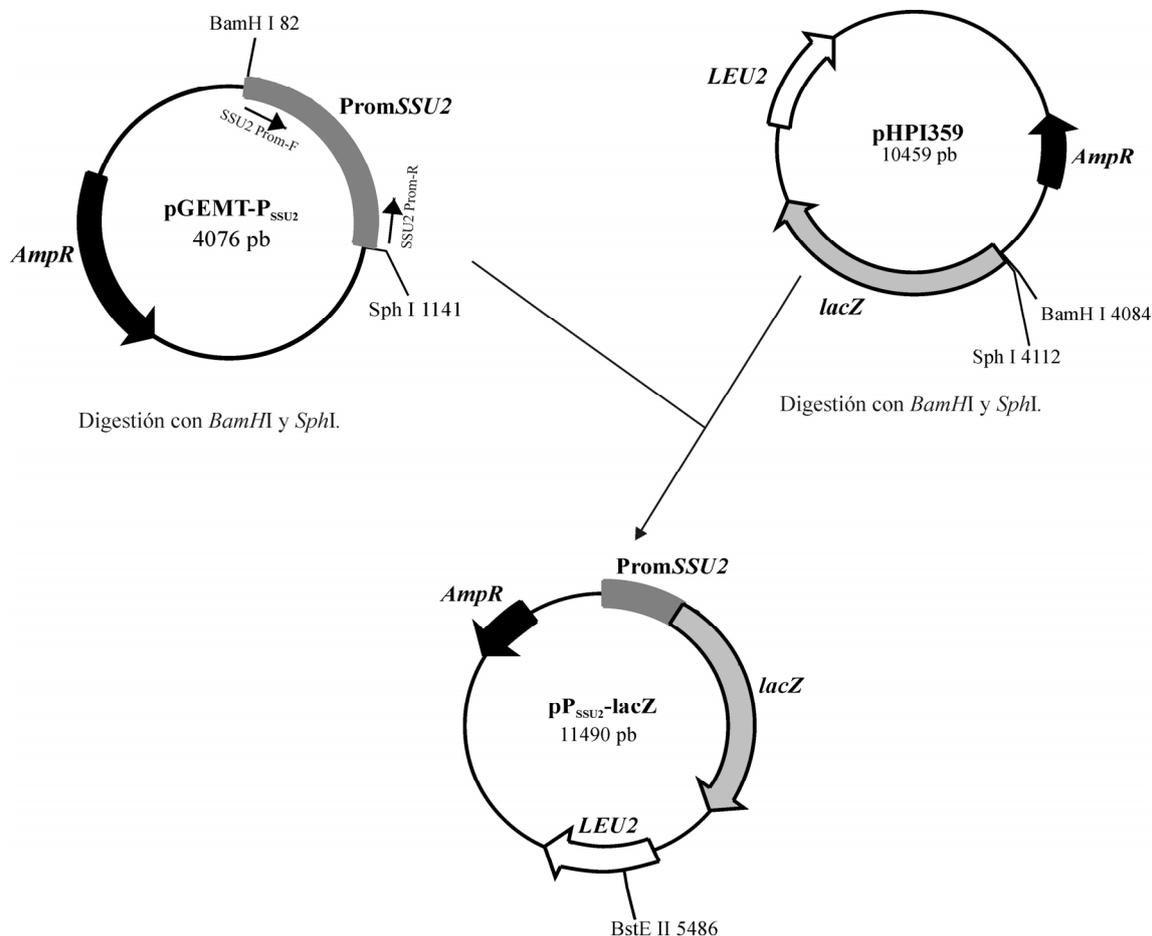


Figura 101. Construcción del vector pPromSSU2-lacZ. Se caracteriza por tener la región promotora de *SSU2* fusionada al gen reportero *lacZ*.

7.4.3.2. Estrategia de integración.

El plásmido resultante, pP_{SSU2}-lacZ, de unas 11490 pb, se linealizó en *LEU2* con *Bst*EII y se transformaron cepas *leu2⁻*. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en medios sin leucina. La selección de las cepas con una única copia de esta construcción se realizó primeramente, midiendo la actividad β -galactosidasa en filtros. Así, nos quedamos con los clones que presentan un color azul menos intenso y a éstos les medimos la actividad pero esta vez, de extractos libres de células. Los clones que presentan una menor actividad son los que tienen una única copia. Por último, realizamos otra comprobación pero esta vez por PCR de genómico.

Este método de determinación de copia única consiste en la amplificación del gen *HpLEU2* presente en el plásmido de partida pHPI359 usando como cebadores secuencias del gen *ScURA3*, que flanquean al gen *HpLEU2*. En el caso de que el evento de integración haya sido único, la amplificación del gen *HpLEU2* no tendrá lugar, ya que la disposición de los oligos en direcciones opuestas impide la síntesis del ADN. Por el contrario, cuando el evento de integración haya sido múltiple, la PCR rendirá un fragmento de 2.5 kpb correspondiente al gen *LEU2* [34].

7.4.4. Expresión de *S. cerevisiae SSU1* en *H. polymorpha*.

7.4.4.1. Construcción del vector pP_{SSU2}-ScSSU1LEU2.

La construcción de este vector se hizo necesaria para poder expresar *ScSSU1* en nuestra levadura. Para ello fusionamos al promotor de *SSU2* la ORF de *ScSSU1* y parte de la secuencia 3' no codificante de este gen. En un primer paso amplificamos con *Pfu* polimerasa 1061 pb de la secuencia promotora de *SSU2* con los oligos SSU2Prom-F y PromSSU2-R, para luego ser clonada en pGEM-T Easy, dando lugar al vector pGEMT-P_{SSU2I}. Este paso previo lo realizamos para facilitar la digestión con las enzimas de restricción *BglIII* y *SacI*. Seguidamente amplificamos un fragmento de 1883 pb conteniendo la ORF de *ScSSU1* sin su ATG más 503 pb de la región 3' no codificante mediante el empleo de la pareja de cebadores ScSSU1-F más ScSSU1ter-R. Este fragmento de ADN también fue clonado en pGEM-T Easy para su posterior digestión con las mismas enzimas, liberando un fragmento de 1931 pb que fue clonado en fase en el plásmido anterior (pGEMT-P_{SSU2I}). La construcción de este vector, pP_{SSU2I}-ScSSU1, se completó con la inserción, en el sitio *NaeI*, de un fragmento *NotI* de 1525 pb aislado del vector pGEMT-LEU2 relleno con *Klenow*, que contiene el gen marcador *LEU2*. El vector resultante se le denominó pP_{SSU2I}-ScSSU1LEU2.

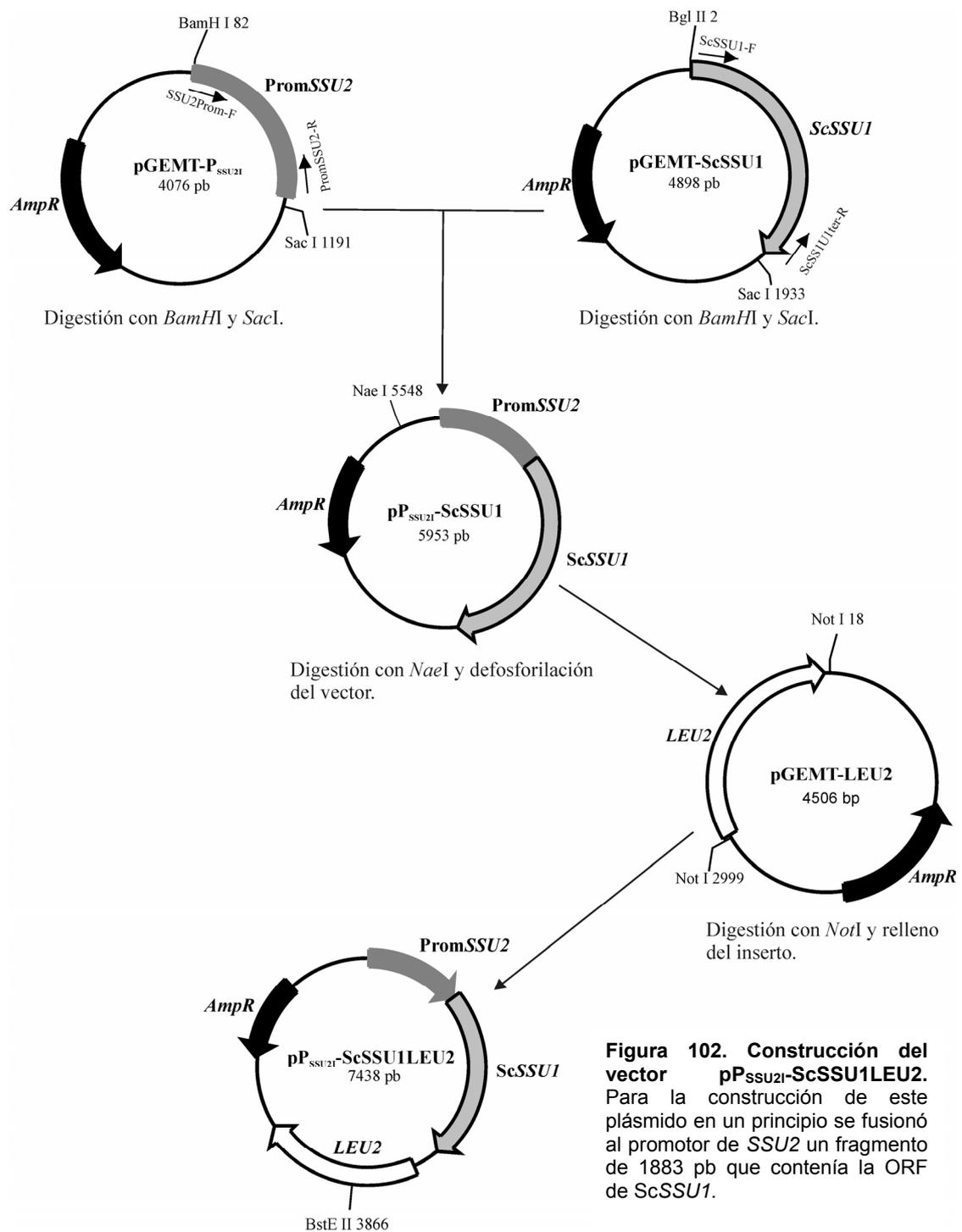


Figura 102. Construcción del vector $pP_{SSU21}-ScSSU1LEU2$. Para la construcción de este plásmido en un principio se fusionó al promotor de *SSU2* un fragmento de 1883 pb que contenía la ORF de *ScSSU1*.

7.4.4.2. Estrategia de integración.

El vector $pP_{SSU21}-ScSSU1LEU2$ linearizado en el gen *LEU2* con *Bst*EII se usó para transformar cepas *leu2⁻*. Más concretamente se transformaron cepas $\Delta ssu2 leu2⁻$, con lo cual los transformantes se recuperaron por su capacidad de crecer en medios carentes de leucina. La selección de las cepas portadoras de tal construcción se hizo Transportadores de nitrato y potasio en *Hansenula polymorpha*.

aprovechando el fenotipo de sensibilidad a sulfito que muestran los mutantes $\Delta ssu2$, de forma que nos quedamos con aquellas cepas que revertían el fenotipo de sensibilidad a este compuesto. Este hecho también nos sirvió para comprobar la funcionalidad de esta construcción.

7.4.5. Etiquetado de *SSU2* con el epítipo HA y la proteína verde fluorescente (GFP).

SSU2 fue etiquetado en el extremo carboxilo terminal con el epítipo HA y con la proteína verde fluorescente (eGFP). El plásmido portador de las 6 copias del epítipo HA se denomina pHA [185] y el portador de la eGFP es pANL31 [161]. Para ello amplificamos la ORF de *SSU2* sin el codón de parada con la ayuda de los oligos SSU2orf-R y SSU2orf-R. Este fragmento de 1188 pb fue clonado en pGEM-T Easy para ser digerido con *Bg*III, liberando un fragmento de 1182 pb que se utilizará tanto para ser clonado en fase en pHA previa digestión con *Bg*III y defosforilación como para clonarlo en pANL31, siguiendo los mismos pasos que para pHA. La construcción de pSSU2-HA y pSSU2-eGFP se detalla a continuación.

La integración de esta construcción se hace posible tras linearizar los plásmidos pSSU2-HA y pSSU2-eGFP en el locus *SSU2* usando una enzima de corte único, que en este caso fue *Bc*II. Con estos vectores linearizados se transformó una cepa WT. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en presencia del antibiótico zeocina, pues estos vectores contienen el gen *ble*. La linearización del vector dentro de la secuencia de la proteína (*Ssu2*) permite dirigir la integración hacia el gen de la proteína de interés, de tal manera que la proteína resultante se expresará bajo su promotor nativo. Con esta estrategia se crean dos formas de la proteína, una funcional con su propio promotor y fusionada al epítipo específico y otra no funcional al carecer de la mayor parte de la región aminoterminal y de promotor para su expresión. Esta duplicidad no causa eventos posteriores de recombinación como consecuencia de la alta estabilidad de las moléculas de ADN integradas en el genoma de *H. polymorpha*.

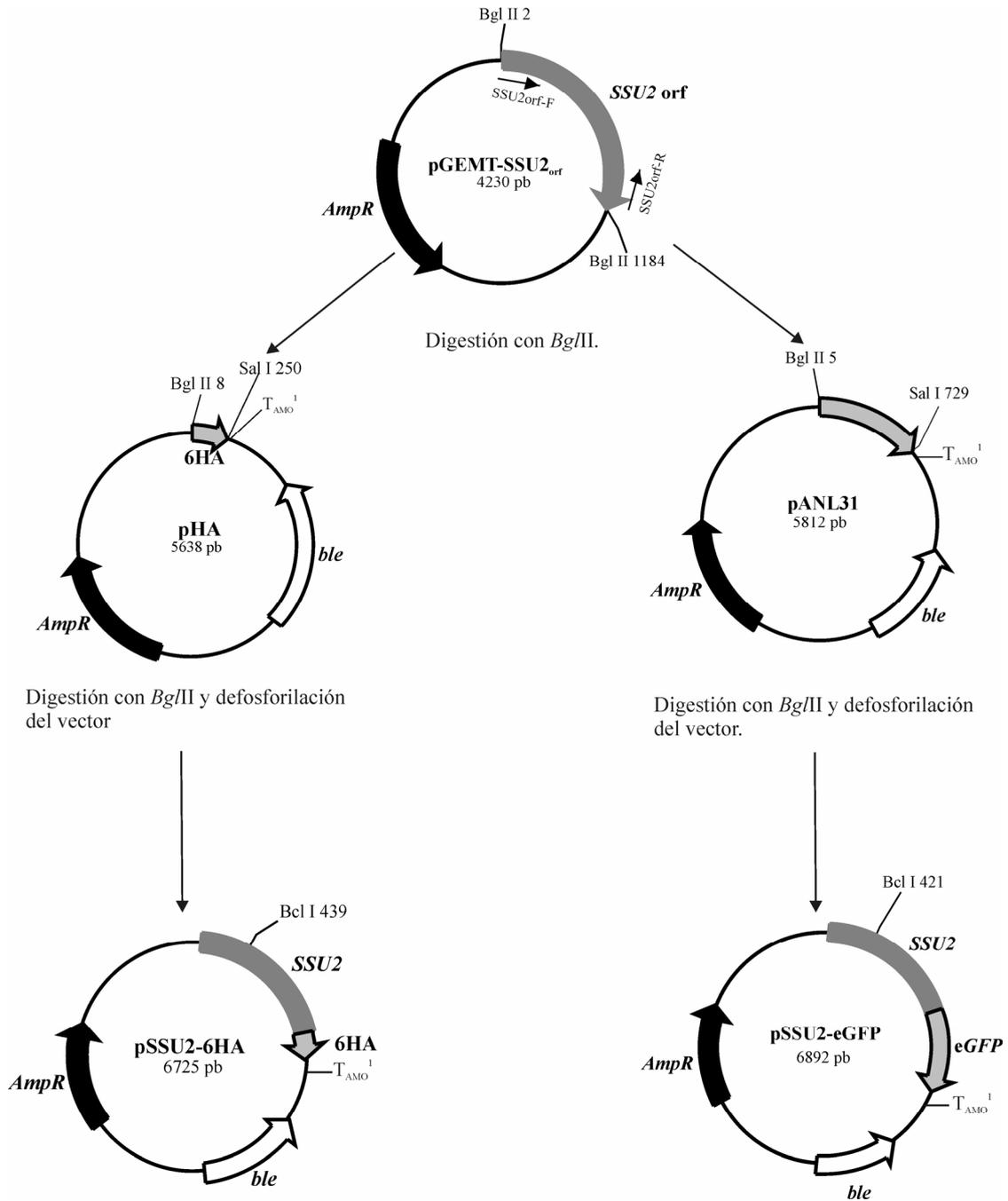


Figura 103. Construcción de los vectores pSSU2-HA y pSSU2-eGFP.

La correcta integración de los plásmidos en el locus *SSU2* se comprobó por PCR mediante el uso de un oligo que hibrida en una secuencia específica del vector y otro con secuencia del gen *SSU2* no presente en el vector. Como oligos que hibridaban en una secuencia específica del vector empleamos oligos que hibridaban en la zona de los epítomos, es decir, en la zona de las 6 copias de HA empleamos el cebador tag-R, y

en la zona de la eGFP, empleamos el oligo G2. Estos oligos se combinaron con el oligo SSU2-F, el cual hibrida en el gen *SSU2* pero en una secuencia no existente en el vector.

7.4.6. Expresión de *SSU2* en ovocitos de *Xenopus laevis*.

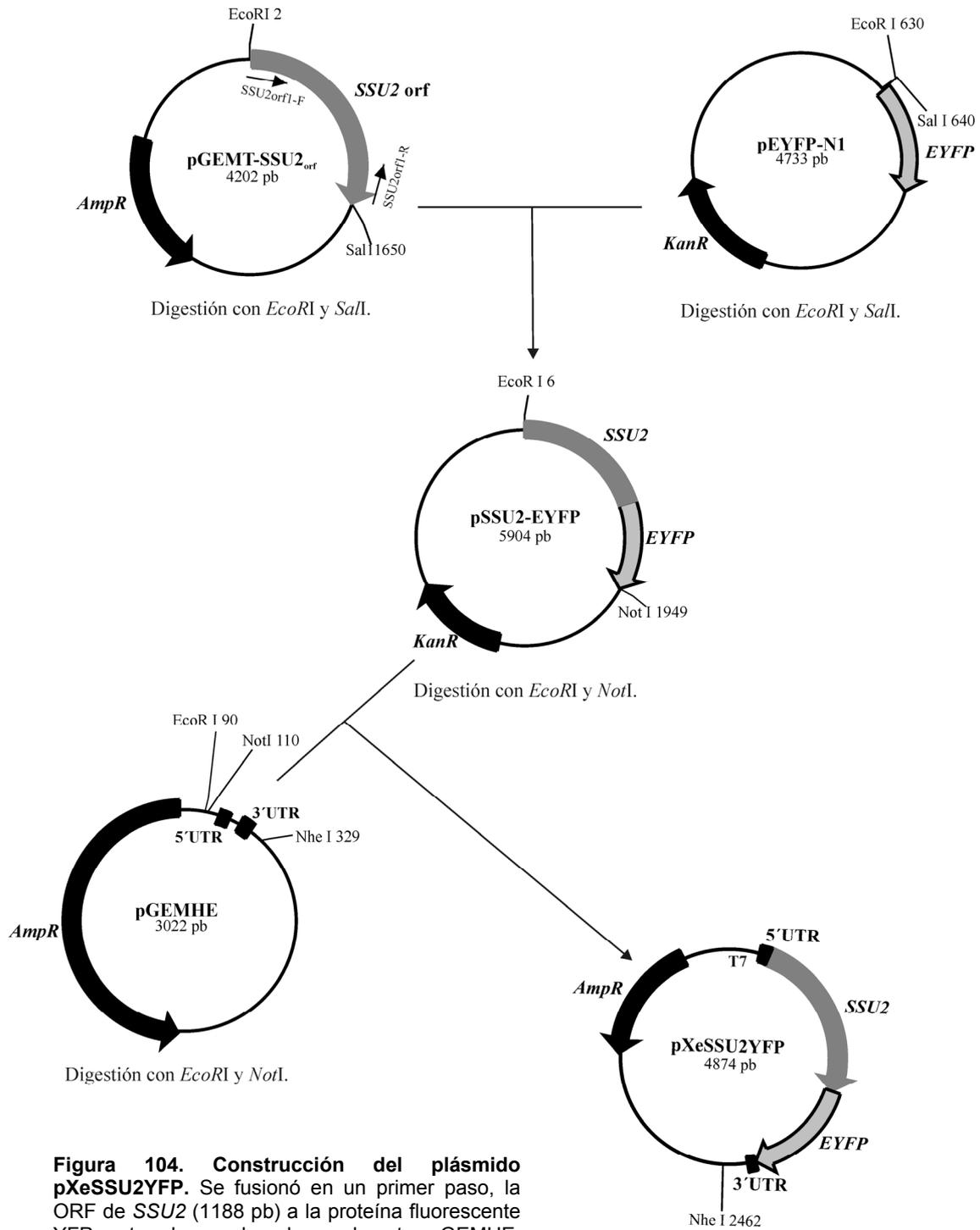


Figura 104. Construcción del plásmido pXeSSU2YFP. Se fusionó en un primer paso, la ORF de *SSU2* (1188 pb) a la proteína fluorescente YFP, antes de ser clonada en el vector pGEMHE, que contiene 1098 pb que no se transcriben en la región 5' (5'UTR) y 279 pb en la región 3' (3'UTR).

La expresión de *SSU2* en este sistema heterólogo se realizó para confirmar la función que esta proteína tiene en nuestra levadura. En un primer paso, se fusionó la ORF de *SSU2* a la proteína fluorescente EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), usando el vector comercial pEYFP-N1 (Clontech, Takara, EEUU). Para ello se amplificaron 1188 pb del gen *SSU2* usando los oligos SSU2orfII-F y SSU2orfII-R. Este fragmento fue clonado en pGEM-T Easy para luego ser digerido con *EcoRI* y *SalI*, liberando un fragmento de 1181 pb que se clonó en fase en el plásmido pEYFP-N1 previa digestión del mismo con *EcoRI* y *SalI*, dando lugar al vector pSSU2-EYFP de unas 5904 pb.

En un segundo paso, clonamos esta construcción, es decir, la ORF de *SSU2* fusionada a EYFP en el plásmido más usado para la síntesis de ARNm en *Xenopus*, el pGEMHE. Este plásmido se caracteriza por tener unas regiones no codificantes de la β -globina que favorecen la expresión de proteínas heterólogas. El fragmento de *SSU2* fusionado a EYFP fue extraído del vector pSSU2-EYFP mediante el corte con *EcoRI* y *NotI* y fue clonado en pGEMHE, el cual había sido digerido previamente con las mismas enzimas. El plásmido resultante pXeSSU2YFP fue tratado como se explica en el apartado 6.6.1 de materiales y métodos para sintetizar el ARNc.

7.4.7. Fusión del promotor de *HAK1* al gen *lacZ*.

Esta construcción se realizó para estudiar la expresión de *HAK1*. Esto se consiguió fusionando el promotor de *HAK1* al gen reportero *lacZ*. Se amplificaron 1080 pb de la región 5' no codificante más 40 pb de la región codificante de *HAK1*, mediante el uso de los oligos ProHAK1-F y ProHAK1-R. El fragmento resultante fue clonado en pGEMT-*Easy* para luego ser digerido con *BamHI* y *HindIII*, liberando un fragmento de 1114 pb, el cual fue clonado en pHPI359 tras ser digerido con las mismas enzimas.

El plásmido pP_{HAK1}-*lacZ* fue linearizado en *LEU2* y utilizado para transformar cepas *leu2⁻*. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en un medio sin este aminoácido, seleccionándose aquellos que portaban la construcción determinando la actividad β -galactosidasa en filtro. La determinación de copia única se realizó como ya se explicó anteriormente.

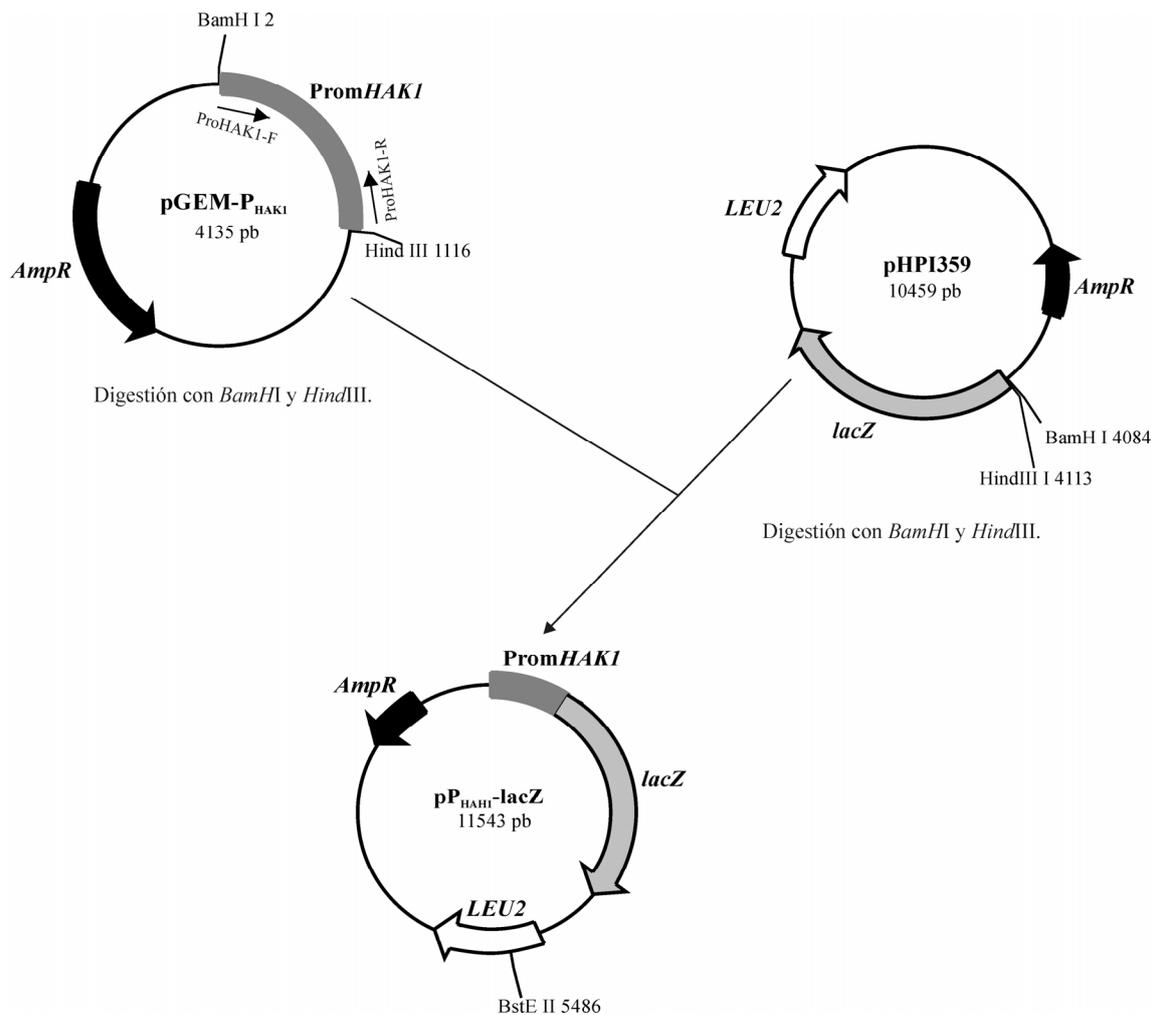


Figura 105. Construcción del vector pP_{HAK1}-lacZ.

7.4.8. Fusión del promotor de *TRK1* al gen *lacZ*.

También nos planteamos estudiar la expresión del gen *TRK1* utilizando la fusión al gen reportero *lacZ*. La estrategia seguida fue la misma que para el caso anterior. Amplificamos 1051 pb de la región promotora, de la cual 40 pb pertenecen a la región 5' codificante. Se amplificó con los oligos ProTRK1-F y ProTRK1-R usando como molde el vector pGEM-trk1 [184]. Este fragmento después de ser clonado en pGEM-T Easy fue digerido con *Bam*HI y *Sph*I. El fragmento de ADN liberado de unos 976 pb fue clonado en pHPI359, para lo cual este vector fue digerido con las mismas enzimas. El plásmido final denominado pP_{TRK1}-lacZ fue linearizado en el locus *LEU2* antes de transformar cepas *leu2*⁻. La selección de los transformantes portadores de la construcción se realizó igual que para el caso anterior.

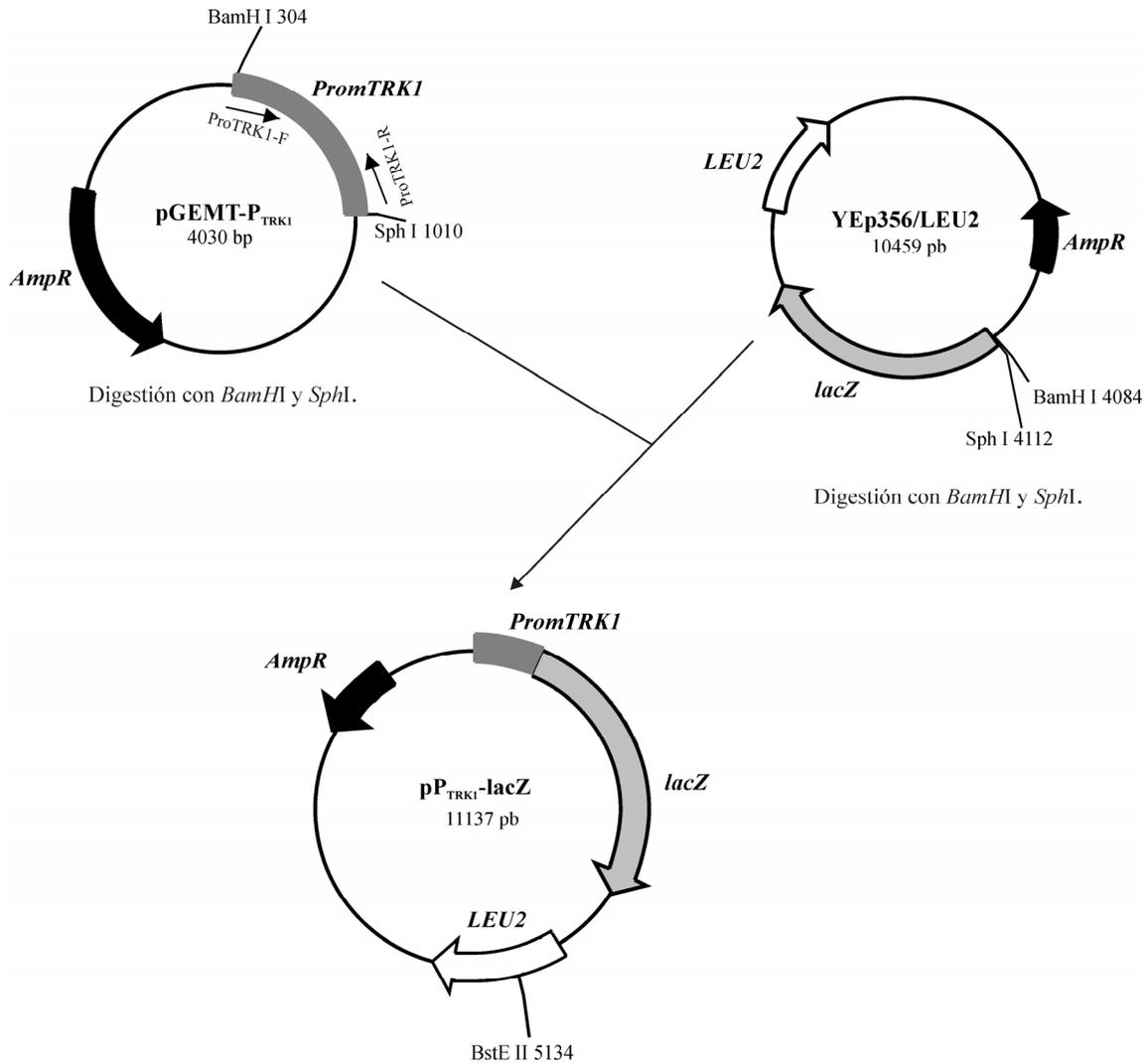


Figura 106. Construcción del vector $pP_{TRK1}-lacZ$.

7.4.9. Etiquetado de *HAK1* con el epítipo HA y con GFP.

La construcción de los plásmidos $pHAK1-HA$ y $pHAK1-GFP$ se realizó para cuantificar los niveles de proteína Hak1 y estudiar la localización celular de la misma. Se partió del plásmido $pGEMT-HAK1gfp$ [185], el cual contiene la ORF de *HAK1* más 1074 pb de la región 5' no codificante. Mediante la digestión con *HindIII* y *BamHI* se aisló un fragmento de 1912 pb que contiene casi la totalidad de la ORF de *HAK1*, le faltan 369 pb de la región codificante hacia el extremo 5'. Estas mismas enzimas se usaron para linearizar tanto el plásmido pHA como el $pANL31$ (portador de la eGFP). Los plásmidos $pHAK1-HA$ y $pHAK1-GFP$ se detallan a continuación (Fig. 107).

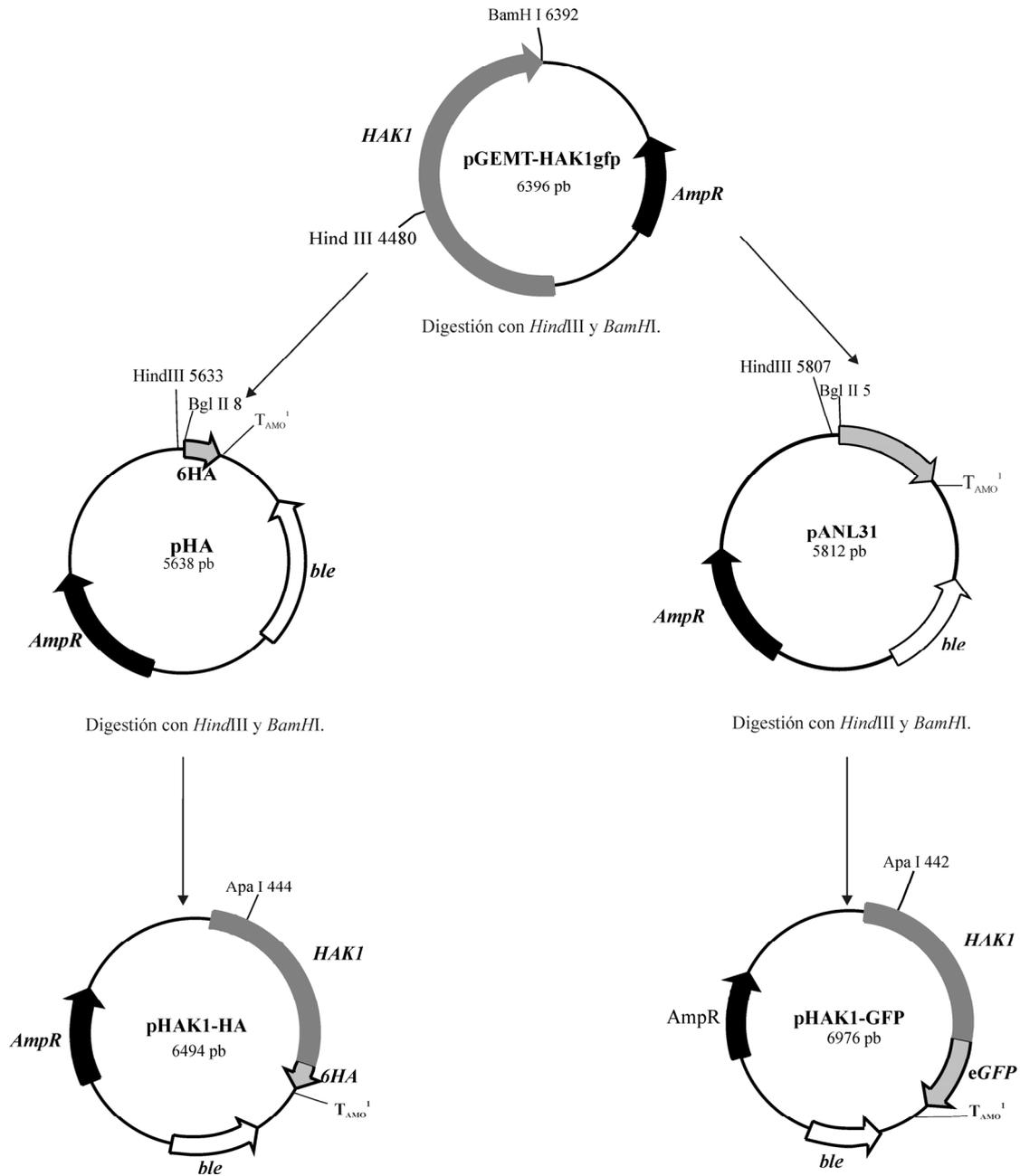


Figura 107. Esquema de la construcción de los plásmidos pHAK1-HA y pHAK1-GFP.

La linearización del plásmido en la ORF de *HAK1* se hizo en el sitio *ApaI* y con esta construcción se transformaron cepas sensibles a zeocina. La búsqueda de las cepas en las que se produce la sustitución de la copia genómica de *HAK1* por la copia etiquetada con HA se selecciona por inmunoblot mediante extractos obtenidos por tratamiento alcalino (apartado 7.1 de materiales y métodos) y por PCR. En el caso de la sustitución de la copia genómica por la copia fusionada a eGFP se selecciona por

visualización directa de los transformantes en el microscopio de fluorescencia con los filtros apropiados (Fig. 108).

Sabiendo que el promotor de *HAK1* se induce por ausencia de potasio, extendimos los transformantes en placas con 0.05 mM de KCl. Tras 48 h a 37°C observamos la masa celular bajo el microscopio. Los clones positivos se distinguen del resto por la fluorescencia verde brillante que emitieron. De estos clones se extrajo el ADN genómico para confirmar la fusión por PCR con los oligos HAK1gfp-F y G2.

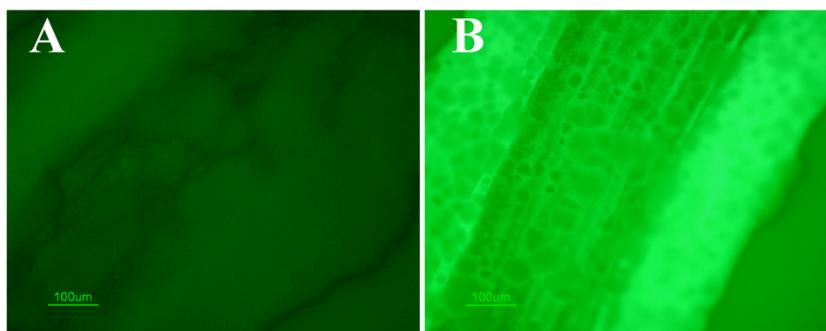


Figura 108. Identificación de clones positivos para la fusión Hak1-GFP mediante observación de la fluorescencia. Los clones de levaduras obtenidos de la transformación con pHAK1-GFP fueron extendidos sobre placas de medio mínimo con 0.05 mM de KCl y al día siguiente se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando el juego de filtros para GFP y el objetivo 4X. **B**, clon expresando Hak1-GFP; **A**, clon donde la integración del plásmido pHAK1-GFP no ha ocurrido correctamente.

7.4.10. Vectores portadores de otras variantes de la proteína verde fluorescente.

La fusión de la proteína verde fluorescente a proteínas de membrana muchas veces produce pérdida de funcionalidad. Por este motivo se intentaron usar variantes de GFP que presentaban una secuencia espaciadora que codifica para el péptido “SGAGAGAGAIL”. Esta secuencia espaciadora parece facilitar el correcto plegamiento de la proteína fluorescente fusionada a nuestra proteína de interés. Se clonaron 3 tipos de proteínas fluorescentes que se diferencian por sus características espectrales: yeGFP (em507, ex488 nm), EYFP (em527, ex513 nm) y RedStart (em583, ex558).

Para la construcción de estos vectores se siguió la misma estrategia: amplificación de la ORF de las distintas proteínas fluorescentes precedida por la secuencia espaciadora, ligamiento en pGEMT-*Easy* y clonaje en pANL31, el cual previamente había sido digerido con *Bgl*III y *Sal*I para liberar la secuencia codificadora

de la eGFP. La tabla 13 recoge los oligos empleados para la amplificación de las distintas GFPs, así como el tamaño del fragmento amplificado.

Tabla 13. Oligos empleados para la amplificación de las 3 variantes de GFPs.

Tipo de GFP	Oligos empleados	Fragmento amplificado (pb)
yeGFP	yeGFP-F, yeGFP-R	795
EYFP	yeGFP-F, EYFP-R	838
RedStart	yeGFP-F, RedStart-R	768

Una vez finalizada la construcción de los vectores pyeGFP, pEYFP y pRedStart, se probó la funcionalidad de los mismos fusionándoles la ORF de *HAK1*. Esto se consiguió digiriendo los vectores anteriores con *HindIII* y *BglII* y ligando en ellos un fragmento de unos 1.907 pb portador de casi la totalidad de la ORF de *HAK1*. Los vectores resultantes se denominaron: pHAK1-yeGFP, pHAK1-EYFP y pHAK1-RedStart. Se muestra a modo de ejemplo la construcción del plásmido pHAK1-RedStart (Fig. 109).

Tras la linearización de los vectores en el sitio *ApaI*, se procedió a transformar cepas sensibles a zeocina. La búsqueda de las cepas en las que se produce la sustitución de la copia genómica de *HAK1* por la copia fusionada a GFP se selecciona, igual que en el caso anterior, por visualización directa de los transformantes en el microscopio de fluorescencia y PCR (Fig. 110).

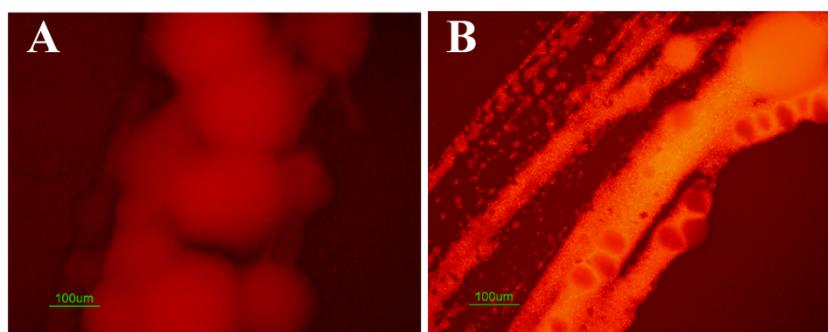


Figura 110. Identificación de clones positivos para la fusión Hak1-RedStart mediante observación de la fluorescencia. Los clones de levaduras obtenidos de la transformación con pHAK1-RedStart fueron extendidos sobre placas de medio mínimo con 0.05 mM de KCl y al día siguiente se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando el juego de filtros para RedStart y el objetivo 4X. **B**, clon expresando Hak1-RedStart; **A**, clon donde la integración del plásmido pHAK1-redStart no ha ocurrido correctamente.

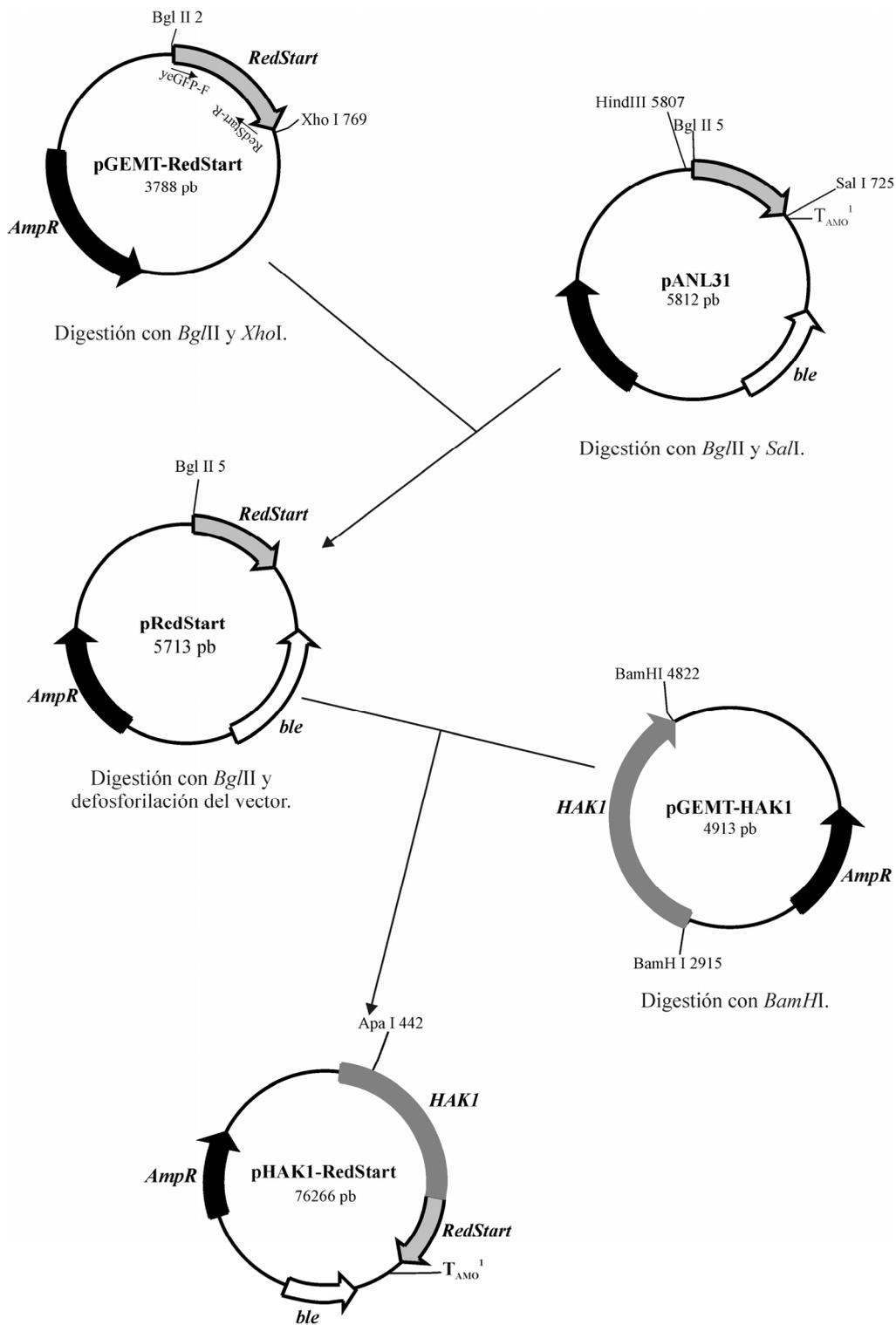
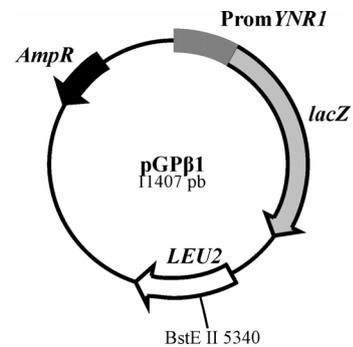


Figura 109. Se representa a modo de ejemplo la construcción del vector pRedStart y del plásmido pHAK1-RedStart.

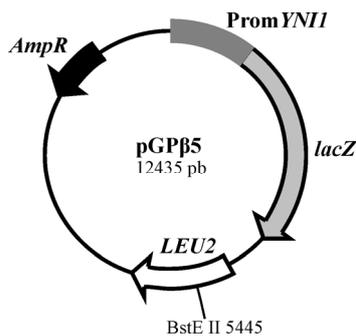
7.4.11. Otros plásmidos usados en este trabajo.

7.4.11.1. pGBβ1.

Este plásmido se utilizó para cuantificar la expresión del gen de la nitrato reductasa mediante actividad β-galactosidasa. Se deriva del vector pHPI359 y contiene, junto con el marcador *LEU2* de *H. polymorpha*, 939 pb de la region 5' no codificadora de *YNRI* y 21 pb de la ORF de este gen. Esta secuencia se encuentra en fase con el gen reportero *lacZ* [34].



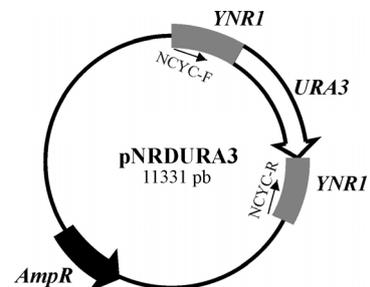
7.4.11.2. pGBβ5.



Este vector, similar al anterior, se utilizó para cuantificar en este caso la expresión del gen de la nitrito reductasa midiendo la actividad β-galactosidasa. Deriva del mismo vector, pero contiene 1520 pb de la región no codificante del gen *YNII* más 468 pb de la región codificante fusionada en fase al gen *lacZ*.

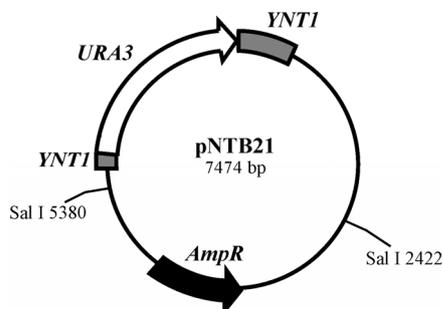
7.4.11.3. pNRDURA3.

Derivado de pBS. Se caracteriza por poseer un fragmento de ADN genómico con una delección en el gen *YNRI* y el gen *URA3* clonado en este sitio. Este fragmento se extrae por PCR y se usa para la interrupción del gen de la nitrato reductasa. El rastreo de los transformantes en los que se haya producido la interrupción de este gen se realiza por resistencia a clorato y por PCR [15].



7.4.11.4. pNTB21.

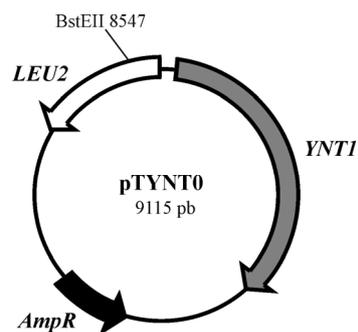
Este plásmido se usó para interrumpir *YNT1*. Posee el gen *YNT1* delecionado y el gen *URA3* clonado en este sitio. El fragmento que se usa para interrumpir (4516 pb) se obtiene por digestión de este plásmido con *Sall*.



La búsqueda de transformantes que tengan *YNT1* interrumpido se hace por consumo de nitrato (los mutantes $\Delta ynt1$ no consumen nitrato en las condiciones ensayadas) y también por PCR.

7.4.11.5. pTYNTO.

Este plásmido deriva de pBluescript y contiene el gen *YNT1* (ORF más 1737 y 469 pb de la región 5' y 3' no codificante respectivamente) junto con el gen marcador *LEU2*. Se empleó para complementar la mutación $\Delta ynt1$ porque contiene la ORF de *YNT1* y secuencias 5' y 3' no codificantes suficientes para permitir la expresión del gen, pero también nos sirvió para obtener cepas portadoras de varias copias de *YNT1*, denominadas n*YNT1*.



VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA.

A

1. **Abe, F. and H. Iida.** 2003. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol. Cell. Biol.* **23**:7566-7584.
2. **Agaphonov, M. O., A. I. Poznyakovski, A. I. Bogdanova, and M. D. Ter-Avanesyan.** 1994. Isolation and characterization of the *LEU2* gene of *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **10**:509-513.
3. **Ahn, S. J., R. Shin, and D. P. Schachtman.** 2004. Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K^+ uptake. *Plant Physiology* **134**:1135-1145.
4. **Amerik, A. Y., J. Nowak, S. Swaminathan, and M. Hochstrasser.** 2000. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* **11**:3365-3380.
5. **Anderson, J. A., S. S. Huprikar, L. V. Kochian, W. J. Lucas, and R. F. Gaber.** 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **89**:3736-3740.
6. **Andrianopoulos, A., S. Kourambas, J. A. Sharp, M. A. Davis, and M. J. Hynes.** 1998. Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* **180**:1973-1977.
7. **Ane-Drummond, C. E. and A. D. M. Glass.** 1983. Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. II. Regulation of NO_3^- efflux by NH_4^+ . *Plant Physiology* **73**:105-110.
8. **Ardie, S. W., L. Xie, R. Takahashi, S. Liu, and T. Takano.** 2009. Cloning of a high-affinity K^+ transporter gene *PutHKT2.1* from *Puccinellia tenuiflora* and its functional comparison with *OsHKT2.1* from rice in yeast and *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **60**:3491-3502.
9. **Arino, J., J. Ramos, and H. Sychrova.** 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**:95-120.
10. **Aslam, M., R. L. Travis, and R. C. Huffaker.** 1994. Stimulation of nitrate and nitrite efflux by ammonium in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology* **106**:1293-1301.
11. **Aslam, M., R. L. Travis, and D. W. Rains.** 1996. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. *Plant Physiology* **112**:1167-1175.
12. **Aslam, M., R. L. Travis, D. W. Rains, and R. C. Huffaker.** 1996. Effect of root perturbation and excision on nitrate influx and efflux in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Physiol Plant* **97**:425-432.
13. **Avila, J., C. Gonzalez, N. Brito, F. Machin, M. D. Perez, and J. M. Siverio.** 2002. A second Zn(II)(2)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.

14. **Avila, J., C. Gonzalez, N. Brito, and J. M. Siverio.** 1998. Clustering of the *YNA1* gene encoding a Zn(II)₂Cys₆ transcriptional factor in the yeast *Hansenula polymorpha* with the nitrate assimilation genes *YNT1*, *YNII* and *YNRI*, and its involvement in their transcriptional activation. *Biochem J* **335** (Pt 3):647-652.
15. **Avila, J., M. D. Perez, N. Brito, C. Gonzalez, and J. M. Siverio.** 1995. Cloning and disruption of the *YNRI* gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett* **366**:137-142.
16. **Avram, D. and A. T. Bakalinsky.** 1996. Multicopy *FZF1* (*SUL1*) suppresses the sulfite sensitivity but not the glucose derepression or aberrant cell morphology of a *grr1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**:511-521.
17. **Avram, D. and A. T. Bakalinsky.** 1997. *SSU1* encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:5971-5974.
18. **Avram, D., M. Leid, and A. T. Bakalinsky.** 1999. Fzf1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a positive regulator of *SSU1* transcription and its first zinc finger region is required for DNA binding. *Yeast* **15**:473-480.

B

19. **Banuelos, M. A., R. D. Klein, S. J. exander-Bowman, and A. Rodriguez-Navarro.** 1995. A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J* **14**:3021-3027.
20. **Banuelos, M. A., R. Madrid, and A. Rodriguez-Navarro.** 2000. Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Mol Microbiol* **37**:671-679.
21. **Banuelos, M. A., B. Garciaeblas, B. Cubero, and A. Rodriguez-Navarro.** 2002. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiology* **130**:784-795.
22. **Beaudenon, S., A. Dastur, and J. M. Huibregtse.** 2005. Expression and assay of HECT domain ligases. *Methods Enzymol* **398**:112-125.
23. **Beck, T. and M. N. Hall.** 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**:689-692.
24. **Beck, T., A. Schmidt, and M. N. Hall.** 1999. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* **146**:1227-1238.
25. **Benito, B., B. Garciaeblas, P. Schreier, and A. Rodriguez-Navarro.** 2004. Novel P-Type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot. Cell* **3**:359-368.
26. **Berger, H., R. Pachlinger, I. Morozov, S. Goller, F. Narendja, M. Caddick, and J. Strauss.** 2006. The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Mol Microbiol* **59**:433-446.
27. **Bernreiter, A., A. Ramon, J. Fernandez-Martinez, H. Berger, L. raujo-Bazan, E. A. Espeso, R. Pachlinger, A. Gallmetzer, I. Anderl, C. Scazzocchio, and J. Strauss.** 2007.

- Nuclear export of the transcription factor *nira* is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **27**:791-802.
28. **Bihler, H., R. F. Gaber, C. L. Slayman, and A. Bertl.** 1999. The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H⁺ dependent, K⁺ independent current. *FEBS Lett* **447**:115-120.
 29. **Bihler, H., C. L. Slayman, and A. Bertl.** 2002. Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**:109-118.
 30. **Bimboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
 31. **Blondel, M. O., J. Morvan, S. Dupre, D. Urban-Grimal, R. Haguenaer-Tsapis, and C. Volland.** 2004. Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol. Biol. Cell* **15**:883-895.
 32. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
 33. **Brito, N., J. Avila, M. D. Perez, C. Gonzalez, and J. M. Siverio.** 1996. The genes *YNII* and *YNRI*, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha*, are clustered and co-ordinately regulated. *Biochem J* **317** (Pt 1):89-95.
 34. **Brito, N., M. D. Perez, G. Perdomo, C. Gonzalez, P. Garcia-Lugo, and J. M. Siverio.** 1999. A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct *lacZ* fusions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**:23-29.
 35. **Britto, D. T., M. Y. Siddiqi, A. D. M. Glass, and H. J. Kronzucker.** 2001. Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *PNAS* **98**:4255-4258.
 36. **Brown, R. S., C. Sander, and P. Argos.** 1985. The primary structure of transcription factor TFIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Letters* **186**:271-274.
 37. **Brownlee, A. G. and H. N. Arst, Jr.** 1983. Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *J. Bacteriol.* **155**:1138-1146.
 38. **Bruinenberg, P. M., J. P. Van Dijken, and W. A. Scheffers.** 1983. An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *Microbiology* **129**:965-971.
 39. **Buchner, P., H. Takahashi, and M. J. Hawkesford.** 2004. Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J. Exp. Bot.* **55**:1765-1773.
 40. **Burger, G., J. Strauss, C. Scazzocchio, and B. F. Lang.** 1991. *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.* **11**:5746-5755.

41. **Burger, G., J. Tilburn, and C. Scazzocchio.** 1991. Molecular cloning and functional characterization of the pathway-specific regulatory gene NirA, which controls nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**:795-802.
42. **Bustos-Sanmamed, P., A. Tovar-Mendez, M. Crespi, S. Sato, S. Tabata, and M. Becana.** 2011. Regulation of nonsymbiotic and truncated hemoglobin genes of *Lotus japonicus* in plant organs and in response to nitric oxide and hormones. *New Phytol* **189**:765-776.

C

43. **Calero, F., V. Montiel, Z. Caracuel, F. Cabello-Hurtado, and J. Ramos.** 2004. On the role of Trk1 and Trk2 in *Schizosaccharomyces pombe* under different ion stress conditions. *FEMS Yeast Res* **4**:619-624.
44. **Calero, F., N. Gomez, J. Arino, and J. Ramos.** 2000. Trk1 and Trk2 define the major K⁺ transport system in fission yeast. *J. Bacteriol.* **182**:394-399.
45. **Camargo, A., A. Llamas, R. A. Schnell, J. J. Higuera, D. Gonzalez-Ballester, P. A. Lefebvre, E. Fernandez, and A. Galvan.** 2007. Nitrate signaling by the regulatory gene *NIT2* in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **19**:3491-3503.
46. **Campbell, W. H. and J. R. Kinghorn.** 1990. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends in Biochemical Sciences* **15**:315-319.
47. **Canfield, D. E., A. N. Glazer, and P. G. Falkowski.** 2010. The Evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science* **330**:192-196.
48. **Cannons, A. and J. Cannon.** 2002. The stability of the *Chlorella* nitrate reductase mRNA is determined by the secondary structure of the 5'-UTR: implications for posttranscriptional regulation of nitrate reductase. *Planta* **214**:488-491.
49. **Carreras, M. C., M. C. Franco, J. G. Peralta, and J. J. Poderoso.** 2004. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* **25**:125-139.
50. **Casado, C., L. Yenush, C. Melero, M. C. Ruiz, R. Serrano, J. Perez-Valle, J. Arino, and J. Ramos.** 2010. Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett* **584**:2415-2420.
51. **Casalone, E., C. M. Colella, S. Daly, E. Gallori, L. Moriani, and M. Polsinelli.** 1992. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **22**:435-440.
52. **Chang, A. and C. W. Slayman.** 1991. Maturation of the yeast plasma membrane H⁺ ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* **115**:289-295.
53. **Chen, Y. F., Y. Wang, and W. H. Wu.** 2008. Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. *J Integr Plant Biol* **50**:835-848.
54. **Cherel, I., E. Michard, N. Platet, K. Mouline, C. Alcon, H. Sentenac, and J. B. Thibaud.** 2002. Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel *AKT2* and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14**:1133-1146.

55. **Chiang, T. Y. and G. A. Marzluf.** 1994. DNA recognition by the *NIT2* nitrogen regulatory protein: importance of the number, spacing, and orientation of GATA core elements and their flanking sequences upon *NIT2* binding. *Biochemistry* **33**:576-582.
56. **Chiang, T. Y. and G. A. Marzluf.** 1995. Binding affinity and functional significance of *NIT2* and *NIT4* binding sites in the promoter of the highly regulated nit-3 gene, which encodes nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **177**:6093-6099.
57. **Chiranand, W., I. McLeod, H. Zhou, J. J. Lynn, L. A. Vega, H. Myers, J. R. Yates, III, M. C. Lorenz, and M. C. Gustin.** 2008. *CTA4* transcription factor mediates induction of nitrosative stress response in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **7**:268-278.
58. **Clegg, S., F. Yu, L. Griffiths, and J. A. Cole.** 2002. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol Microbiol* **44**:143-155.
59. **Clotet, J., E. Gari, M. Aldea, and J. Arino.** 1999. The Yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2408-2415.
60. **Coffman, J. A., R. Rai, D. M. Loprete, T. Cunningham, V. Svetlov, and T. G. Cooper.** 1997. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:3416-3429.
61. **Cooper, T. G.** 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**:223-238.
62. **Corker, H. and R. K. Poole.** 2003. Nitric Oxide formation by *Escherichia coli*: Dependence on nitrite reductase, the no-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **278**:31584-31592.
63. **Corratge, C., S. Zimmermann, R. Lambilliotte, C. Plassard, R. Marmeisse, J. B. Thibaud, B. Lacombe, and H. Sentenac.** 2007. Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *J. Biol. Chem.* **282**:26057-26066.
64. **Corratge-Faillie, C., M. Jabnune, S. Zimmermann, A. A. Very, C. Fizames, and H. Sentenac.** 2010. Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci* **67**:2511-2532.
65. **Courchesne, W. E. and B. Magasanik.** 1983. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **3**:672-683.
66. **Cove, D. J.** 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol Rev Camb Philos Soc* **54**:291-327.
67. **Cox, K. H., R. Rai, M. Distler, J. R. Daugherty, J. A. Coffman, and T. G. Cooper.** 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.
68. **Crawford, N. M. and H. N. Arst.** 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu Rev Genet* **27**:115-146.

69. **Crawford, N. M. and A. D. M. Glass.** 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**:389-395.
70. **Crespo, J. L., S. az-Troya, and F. J. Florencio.** 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **139**:1736-1749.
71. **Crespo, J. L. and M. N. Hall.** 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:579-591.
72. **Crete, P., M. Caboche, and C. Meyer.** 1997. Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**:625-634.

D

73. **Dancis, A., D. Haile, D. S. Yuan, and R. D. Klausner.** 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* **269**:25660-25667.
74. **Davidian, J. C. and S. Kopriva.** 2010. Regulation of sulfate uptake and assimilation-the same or not the same? *Mol Plant* **3**:314-325.
75. **De Angeli, A., D. Monachello, G. Ephritikhine, J. M. Frachisse, S. Thomine, F. Gambale, and H. Barbier-Brygoo.** 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**:939-942.
76. **De Craene, J. O., O. Soetens, and B. Andre.** 2001. The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J. Biol. Chem.* **276**:43939-43948.
77. **Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J. F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J. M. Claverie, and O. Gascuel.** 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**:W465-W469.
78. **Devasahayam, G., D. Ritz, S. B. Helliwell, D. J. Burke, and T. W. Sturgill.** 2006. Pmr1, a Golgi Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is a regulator of the target of rapamycin (TOR) signaling pathway in yeast. *PNAS* **103**:17840-17845.
79. **Dordas, C., J. Rivoal, and R. D. Hill.** 2003. Plant Haemoglobins, Nitric Oxide and Hypoxic Stress. *Ann. Bot.* **91**:173-178.
80. **Doyle, D. A., J. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon.** 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.
81. **Dupre, S. and R. Haguenaer-Tsapis.** 2001. Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol. Cell. Biol.* **21**:4482-4494.
82. **Dupre, S., D. Urban-Grimal, and R. Haguenaer-Tsapis.** 2004. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**:89-111.
83. **Durell, S. R., Y. Hao, T. Nakamura, E. P. Bakker, and H. R. Guy.** 1999. Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. *Biophys J* **77**:775-788.

E

84. **Eddy, A. A. and P. G. Hopkins.** 1985. The putative electrogenic nitrate-proton symport of the yeast *Candida utilis*. Comparison with the systems absorbing glucose or lactate. *Biochem J* **231**:291-297.
85. **Exley, G. E., J. D. Colandene, and R. H. Garrett.** 1993. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of *nit-6*, the structural gene for nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **175**:2379-2392.

F

86. **Faber, K. N., P. Haima, W. Harder, M. Veenhuis, and G. AB.** 1994. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet* **25**:305-310.
87. **Fang, F. C.** 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**:820-832.
88. **Fernandez, E. and A. Galvan.** 2008. Nitrate Assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryot. Cell* **7**:555-559.
89. **Fernandez, E. and A. Galvan.** 2007. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* **58**:2279-2287.
90. **Fitzpatrick, K. L., S. D. Tyerman, and B. N. Kaiser.** 2008. Molybdate transport through the plant sulfate transporter *SHST1*. *FEBS Lett* **582**:1508-1513.
91. **Forde, B. G.** 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1465**:219-235.
92. **Fraisier, V., A. Gojon, P. Tillard, and F. niel-Vedele.** 2000. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J* **23**:489-496.
93. **Fu, Y. H. and G. A. Marzluf.** 1987. Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **7**:1691-1696.
94. **Furihata, T., S. Pomprasirt, and H. Sakurai.** 1997. Characteristics of sulfite transport by *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* **38**:398-403.

G

95. **Gaber, R. F., C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**:2848-2859.
96. **Galan, J. M. and R. Haguenaer-Tsapis.** 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* **16**:5847-5854.
97. **Galvan, A. and E. Fernandez.** 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell Mol Life Sci* **58**:225-233.

98. **Galvan, A., J. Cardenas, and E. Fernandez.** 1992. Nitrate reductase regulates expression of nitrite uptake and nitrite reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **98**:422-426.
99. **Galvan, A., J. Rexach, V. Mariscal, and E. Fernandez.** 2002. Nitrite transport to the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*: molecular evidence for a regulated process. *J. Exp. Bot.* **53**:845-853.
100. **Galvan, A., A. Quesada, and E. Fernandez.** 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**:2088-2092.
101. **Gander, S., D. Bonenfant, P. Altermatt, D. E. Martin, S. Hauri, S. Moes, M. N. Hall, and P. Jenoe.** 2008. Identification of the rapamycin-sensitive phosphorylation sites within the Ser/Thr-rich domain of the yeast Npr1 protein kinase. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**:3743-3753.
102. **Gander, S., D. Martin, S. Hauri, S. Moes, G. Poletto, M. A. Pagano, O. Marin, F. Meggio, and P. Jenoe.** 2009. A modified KESTREL search reveals a basophilic substrate consensus for the *Saccharomyces cerevisiae* Npr1 protein kinase. *J Proteome Res* **8**:5305-5316.
103. **Garcia-Sanchez, M. J., M. P. Jaime, A. Ramos, D. Sanders, and J. A. Fernandez.** 2000. Sodium-dependent nitrate transport at the plasma membrane of leaf cells of the marine higher plant *Zostera marina* L. *Plant Physiology* **122**:879-886.
104. **Garciadeblas, B., J. Barrero-Gil, B. Benito, and A. Rodriguez-Navarro.** 2007. Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: PpHak1 plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant J* **52**:1080-1093.
105. **Gardner, P. R.** 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J Inorg Biochem* **99**:247-266.
106. **Gaynard, F., M. Cerutti, C. Horeau, G. Lemaillet, S. Urbach, M. Ravallec, G. Devauchelle, H. Sentenac, and J. B. Thibaud.** 1996. The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the Akt1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **271**:22863-22870.
107. **Gerrard, S. R., B. P. Levi, and T. H. Stevens.** 2000. Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment. *Traffic* **1**:259-269.
108. **Gerrard, S. R., A. B. Mecklem, and T. H. Stevens.** 2000. The yeast endosomal t-SNARE, Pep12p, functions in the absence of its transmembrane domain. *Traffic* **1**:45-55.
109. **Gierth, M., P. Maser, and J. I. Schroeder.** 2005. The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **137**:1105-1114.
110. **Glickman, M. H. and A. Ciechanover.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**:373-428.
111. **Gonzalez, B., J. Francois, and M. Renaud.** 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**:1347-1355.

112. **Gonzalez, C., G. Perdomo, P. Tejera, N. Brito, and J. M. Siverio.** 1999. One-step, PCR-mediated, gene disruption in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **15**:1323-1329.
113. **Goossens, A., N. de la Fuente, J. Forment, R. Serrano, and F. Portillo.** 2000. Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7654-7661.
114. **Grabov, A.** 2007. Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family-multiple functions. *Ann. Bot.* **99**:1035-1041.
115. **Grobler, J., F. Bauer, R. E. Subden, and H. J. Van Vuuren.** 1995. The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. *Yeast* **11**:1485-1491.
116. **Guerrero, M. G., J. M. Vega, and M. Losada.** 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **32**:169-204.
117. **Gupta, M., X. Qiu, L. Wang, W. Xie, C. Zhang, L. Xiong, X. Lian, and Q. Zhang.** 2008. KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*). *Mol Genet Genomics* **280**:437-452.

H

118. **Haguenauer-Tsapis, R. and B. Andre.** 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. In: Boles E, Kramer R, editor. *Molecular mechanisms controlling transmembrane transport*, pp. 273-322.
119. **Hanahan D.** 1986. Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover DM, editor. *DNA cloning*. 121-127
120. **Haro, R. and A. Rodriguez-Navarro.** 2002. Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the *TRK1* transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1564**:114-122.
121. **Haro, R., L. Sainz, F. Rubio, and A. Rodriguez-Navarro.** 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **31**:511-520.
122. **Hein, C., J. Y. Springael, C. Volland, R. Haguenauer-Tsapis, and B. Andre.** 1995. *NP11*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Microbiol* **18**:77-87.
123. **Helliwell, S. B., S. Losko, and C. A. Kaiser.** 2001. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell Biol.* **153**:649-662.
124. **Helmick, R. A., A. E. Fletcher, A. M. Gardner, C. R. Gessner, A. N. Hvitved, M. C. Gustin, and P. R. Gardner.** 2005. Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1837-1843.
125. **Hershko, A. and A. Ciechanover.** 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**:425-479.

126. **Hess, D. C., W. Lu, J. D. Rabinowitz, and D. Botstein.** 2006. Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLoS Biol* **4**:e351.
127. **Hettema, E. H., J. Valdez-Taubas, and H. R. Pelham.** 2004. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J* **23**:1279-1288.
128. **Hicke, L.** 1997. Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J* **11**:1215-1226.
129. **Hinze, H. and H. Holzer.** 1985. Effect of sulfite or nitrite on the ATP content and the carbohydrate metabolism in yeast. *Z Lebensm Unters Forsch* **181**:87-91.
130. **Hinze, H. and H. Holzer.** 1985. Accumulation of nitrite and sulfite in yeast cells and synergistic depletion of the intracellular ATP content. *Z Lebensm Unters Forsch* **180**:117-120.
131. **Hinze, H. and H. Holzer.** 1986. Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch Microbiol* **145**:27-31.
132. **Hipkin, C. R.** 1989. Nitrate assimilation in yeasts, p. 51-68. Oxford University Press (OUP), Oxford OX2 6DP.
133. **Hirsch, R. E., B. D. Lewis, E. P. Spalding, and M. R. Sussman.** 1998. A role for the *AKT1* potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**:918-921.
134. **Ho, C. H., S. H. Lin, H. C. Hu, and Y. F. Tsay.** 2009. *CHL1* functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**:1184-1194.
135. **Horak, J.** 2003. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1614**:139-155.
136. **Hromatka, B. S., S. M. Noble, and A. D. Johnson.** 2005. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. *Mol. Biol. Cell* **16**:4814-4826.
137. **Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P. M. Howley.** 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *PNAS* **92**:2563-2567.
- I**
138. **Inoki, K. and K. L. Guan.** 2006. Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol* **16**:206-212.
- J**
139. **Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, and M. Knop.** 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**:947-962.
140. **Jia, W., N. Tovell, S. Clegg, M. Trimmer, and J. Cole.** 2009. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochem J* **417**:297-304.

141. **Jiang, Y. and J. R. Broach.** 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J* **18**:2782-2792.
142. **Johnstone, I. L., P. C. McCabe, P. Greaves, S. J. Gurr, G. E. Cole, M. A. D. Brow, S. E. Unkles, A. J. Clutterbuck, J. R. Kinghorn, and M. A. Innis.** 1990. Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **90**:181-192.
143. **Jokipii-Lukkari, S., A. D. Frey, P. T. Kallio, and H. Haggman.** 2009. Intrinsic non-symbiotic and truncated haemoglobins and heterologous *Vitreoscilla* haemoglobin expression in plants. *J. Exp. Bot.* **60**:409-422.

K

144. **Kataoka, T., N. Hayashi, T. Yamaya, and H. Takahashi.** 2004. Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of *SULTR3.5* as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiology* **136**:4198-4204.
145. **Kataoka, T., A. Watanabe-Takahashi, N. Hayashi, M. Ohnishi, T. Mimura, P. Buchner, M. J. Hawkesford, T. Yamaya, and H. Takahashi.** 2004. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:2693-2704.
146. **Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst, and S. D. Emr.** 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* **162**:413-423.
147. **Kim, E. J., J. M. Kwak, N. Uozumi, and J. I. Schroeder.** 1998. AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* **10**:51-62.
148. **Ko, C. H. and R. F. Gaber.** 1991. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**:4266-4273.
149. **Kohn, M. C., R. L. Melnick, F. Ye, and C. J. Portier.** 2002. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metab. Dispos.* **30**:676-683.
150. **Kolling, R. and C. P. Hollenberg.** 1994. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J* **13**:3261-3271.
151. **Kolling, R. and S. Losko.** 1997. The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *EMBO J* **16**:2251-2261.
152. **Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman.** 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* **5**:834-842.
153. **Kopriva, S., G. Wiedemann, and R. Reski.** 2007. Sulfate assimilation in basal land plants - what does genomic sequencing tell us? *Plant Biol (Stuttg)* **9**:556-564.
154. **Kopriva, S. T. A. N.** 2006. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Ann. Bot.* **97**:479-495.
155. **Kronzucker, H. J., D. T. Britto, R. J. Davenport, and M. Tester.** 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Sci* **6**:335-337.

156. **Kuchler, K., H. G. Dohlman, and J. Thorner.** 1993. The a-factor transporter (*STE6* gene product) and cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **120**:1203-1215.
157. **Kudla, B., M. X. Caddick, T. Langdon, N. M. Martinez-Rossi, C. F. Bennett, S. Sibley, R. W. Davies, and H. N. Arst.** 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.
158. **Kulkarni, A. A., A. T. bul-Hamd, R. Rai, H. El Berry, and T. G. Cooper.** 2001. Gln3p Nuclear Localization and Interaction with Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**:32136-32144.
159. **Kushnirov, V. V.** 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**:857-860.

L

160. **Langdon, T., A. Sheerins, A. Ravagnani, M. Gielkens, M. X. Caddick, and H. N. Arst.** 1995. Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus* transcription factor mediating nitrogen metabolite repression. *Mol Microbiol* **17**:877-888.
161. **Leao-Helder, A. N., A. M. Krikken, M. G. Lunenborg, J. A. Kiel, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei.** 2004. *Hansenula polymorpha* Tup1p is important for peroxisome degradation. *FEMS Yeast Res* **4**:789-794.
162. **Lechenne, B., U. Reichard, C. Zaugg, M. Fratti, J. Kunert, O. Boulat, and M. Monod.** 2007. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology* **153**:905-913.
163. **Lee, R. B. and M. C. Drew.** 1989. Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *J. Exp. Bot.* **40**:741-752.
164. **Leustek, T., M. N. Martin, J. A. Bick, and J. P. Davies.** 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**:141-165.
165. **Lichtenberg-Frate, H., J. D. Reid, M. Heyer, and M. Hofer.** 1996. The SpTRK gene encodes a potassium-specific transport protein TKHp in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Membr Biol* **152**:169-181.
166. **Liman, E. R., J. Tytgat, and P. Hess.** 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**:861-871.
167. **Lin, C. H., J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan, and S. D. Emr.** 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* **135**:714-725.
168. **Lipton, S. A., Y. B. Choi, Z. H. Pan, S. Z. Lei, H. S. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel, and J. S. Stamler.** 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**:626-632.
169. **Liu, K. H. and Y. F. Tsay.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter *CHL1* by phosphorylation. *EMBO J* **22**:1005-1013.

170. **Liu, K. H., C. Y. Huang, and Y. F. Tsay.** 1999. *CHL1* Is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**:865-874.
171. **Loppes, R., M. Radoux, M. C. Ohresser, and R. F. Matagne.** 1999. Transcriptional regulation of the *Nia1* gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the *Nia1* promoter. *Plant Mol Biol* **41**:701-711.
172. **Loque, D., P. Tillard, A. Gojon, and M. Lepetit.** 2003. Gene expression of the NO_3^- transporter *NRT1.1* and the nitrate reductase *NIA1* is repressed in *Arabidopsis* roots by NO_2^- , the product of NO_3^- reduction. *Plant Physiology* **132**:958-967.
173. **Losko, S., F. Kopp, A. Kranz, and R. Kolling.** 2001. Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter *Ste6* into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* mutant. *Mol. Biol. Cell* **12**:1047-1059.
174. **Ludewig, U., B. NeuhSuser, and M. Dynowski.** 2007. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* **581**:2301-2308.
175. **Lundh, F., J. M. Mouillon, D. Samyn, K. Stadler, Y. Popova, J. O. Lagerstedt, J. M. Thevelein, and B. L. Persson.** 2009. Molecular mechanisms controlling phosphate-induced downregulation of the yeast *Pho84* phosphate transporter. *Biochemistry* **48**:4497-4505.

M

176. **Macduff, J. H. and S. B. Jackson.** 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. *J. Exp. Bot.* **43**:525-535.
177. **Machin, F., B. Medina, F. J. Navarro, M. D. Perez, M. Veenhuis, P. Tejera, H. Lorenzo, A. Lancha, and J. M. Siverio.** 2004. The role of *Ynt1* in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **21**:265-276.
178. **Macris, B. J. and P. Markakis.** 1974. Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*. *J Sci Food Agric* **25**:21-29.
179. **Madrid, R., M. J. Gomez, J. Ramos, and A. Rodriguez-Navarro.** 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**:14838-14844.
180. **Magasanik, B. and C. A. Kaiser.** 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**:1-18.
181. **Mangano, S., S. Silberstein, and G. E. Santa-Maria.** 2008. Point mutations in the barley *HvHAK1* potassium transporter lead to improved K^+ -nutrition and enhanced resistance to salt stress. *FEBS Lett* **582**:3922-3928.
182. **Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis, and D. Urban-Grimal.** 1998. A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.* **18**:314-321.
183. **Marini, A. M. and B. Andre.** 2000. In vivo N-glycosylation of the *Mep2* high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol Microbiol* **38**:552-564.

184. **Marten, I. and T. Hoshi.** 1997. Voltage-dependent gating characteristics of the K⁺ channel *KAT1* depend on the N and C termini. *PNAS* **94**:3448-3453.
185. **Martin, Y.** 2008. Regulación postraduccional de los sistemas de transporte de nitrato de alta afinidad en la levadura *Hansenula polymorpha*. Papel de Npr1 en el control de la vía de asimilación de nitrato (Tesis Doctoral). Bioquímica y Biología Molecular: La Laguna.
186. **Martin, Y., F. J. Navarro, and J. M. Siverio.** 2008. Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* nitrate transporter *CHL1* in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Plant Mol Biol* **68**:215-224.
187. **Martin, Y., Y. V. Gonzalez, E. Cabrera, C. Rodriguez, and J. M. Siverio.** 2011. Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *J. Biol. Chem.* M111.
188. **Martinez, J. L., H. Sychrova, and J. Ramos.** 2011. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet Biol* **48**:177-184.
189. **Marzluf, G. A.** 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:17-32.
190. **Marzluf, G. A.** 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **45**:437-461.
191. **Maser, P., Y. Hosoo, S. Goshima, T. Horie, B. Eckelman, K. Yamada, K. Yoshida, E. P. Bakker, A. Shinmyo, S. Oiki, J. I. Schroeder, and N. Uozumi.** 2002. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *PNAS* **99**:6428-6433.
192. **Matsuo, Y., K. Asakawa, T. Toda, and S. Katayama.** 2006. A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:1992-1994.
193. **McClure, P. R., L. V. Kochian, R. M. Spanswick, and J. E. Shaff.** 1990. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots: I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiology* **93**:281-289.
194. **McClure, P. R., L. V. Kochian, R. M. Spanswick, and J. E. Shaff.** 1990. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots: II. Measurement of NO₃⁻ and H⁺ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* **93**:290-294.
195. **Medina, B.** 2009. Los factores transcripcionales del tipo GATA en el metabolismo del nitrógeno y la homeostasis catiónica en la levadura *Hansenula polymorpha* (Tesis Doctoral). Bioquímica y Biología Molecular: La Laguna.
196. **Medintz, I., X. Wang, T. Hradek, and C. A. Michels.** 2000. A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. *Biochemistry* **39**:4518-4526.
197. **Menand, B., T. Desnos, L. Nussaume, F. Berger, D. Bouchez, C. Meyer, and C. Robaglia.** 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *PNAS* **99**:6422-6427.

198. **Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, and J. M. Pardo.** 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:8792-8796.
199. **Merckelbach, A., S. Godecke, Z. A. Janowicz, and C. P. Hollenberg.** 1993. Cloning and sequencing of the *ura3* locus of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and its use for the generation of a deletion by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**:361-364.
200. **Merika, M. and S. H. Orkin.** 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3999-4010.
201. **Michel, B., C. Lozano, M. Rodriguez, R. Coria, J. Ramirez, and A. Pena.** 2006. The yeast potassium transporter *TRK2* is able to substitute for *TRK1* in its biological function under low K^+ and low pH conditions. *Yeast* **23**:581-589.
202. **Miller, A. J. and J. J. Zhou.** 2000. *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**:343-358.
203. **Miller, A. J., X. Fan, M. Orsel, S. J. Smith, and D. M. Wells.** 2007. Nitrate transport and signalling. *J. Exp. Bot.* **58**:2297-2306.
204. **Missall, T. A., J. K. Lodge, and J. E. McEwen.** 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell* **3**:835-846.
205. **Montanini, B., A. R. Viscomi, A. Bolchi, Y. Martin, J. M. Siverio, R. Balestrini, P. Bonfante, and S. Ottonello.** 2006. Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochem J* **394**:125-134.
206. **Mugford, S. G., N. Yoshimoto, M. Reichelt, M. Wirtz, L. Hill, S. T. Mugford, Y. Nakazato, M. Noji, H. Takahashi, R. Kramell, T. Gigolashvili, U. I. Flugge, C. Wasternack, J. Gershenzon, R. Hell, K. Saito, and S. Kopriva.** 2009. Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *Plant Cell* **21**:910-927.
207. **Mulet, J. M., M. P. Leube, S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano.** 1999. A Novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* **19**:3328-3337.

N

208. **Nardi, T., V. Corich, A. Giacomini, and B. Blondin.** 2010. A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene *SSU1* in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Microbiology* **156**:1686-1696.
209. **Nathan, C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**:3051-3064.
210. **Navarrete, C., S. Petrezselyova, L. Barreto, J. L. Martinez, J. Zahradka, J. Arino, H. Sychrova, and J. Ramos.** 2010. Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **10**:508-517.

211. Navarro, F. J., G. Perdomo, P. Tejera, B. Medina, F. Machin, R. M. Guillen, A. Lancha, and J. M. Siverio. 2003. The role of nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res **4**:149-155.
212. Navarro, F. J., F. Machin, Y. Martin, and J. M. Siverio. 2006. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. J. Biol. Chem. **281**:13268-13274.
213. Navarro, F. J., Y. Martin, and J. M. Siverio. 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.
214. Navarro, M. T., E. Guerra, E. Fernandez, and A. Galvan. 2000. Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology **122**:283-290.
215. Neuhauser, B., N. Dunkel, S. V. Satheesh, and J. Morschhauser. 2011. Role of the Npr1 kinase in ammonium transport and signaling by the ammonium permease Mep2 in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell **10**:332-342.
216. Nieves-Cordones, M., A. J. Miller, F. Aleman, V. Martinez, and F. Rubio. 2008. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter *HAK5*. Plant Mol Biol **68**:521-532.

O

217. Ohwaki, Y., M. Kawagishi-Kobayashi, K. Wakasa, S. Fujihara, and T. Yoneyama. 2005. Induction of class-1 non-symbiotic hemoglobin genes by nitrate, nitrite and nitric oxide in cultured rice cells. Plant Cell Physiol. **46**:324-331.
218. Okamoto, M., A. Kumar, W. Li, Y. Wang, M. Y. Siddiqi, N. M. Crawford, and A. D. M. Glass. 2006. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. Plant Physiology **140**:1036-1046.
219. Omura, F. and Y. Kodama. 2004. The N-terminal domain of yeast Bap2 permease is phosphorylated dependently on the Npr1 kinase in response to starvation. FEMS Microbiol Lett **230**:227-234.
220. Omura, F., Y. Kodama, and T. Ashikari. 2001. The N-terminal domain of the yeast permease Bap2p plays a role in its degradation. Biochem Biophys Res Commun **287**:1045-1050.
221. Orsel, M., F. Chopin, O. Leleu, S. J. Smith, A. Krapp, F. niel-Vedele, and A. J. Miller. 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. Plant Physiology **142**:1304-1317.

P

222. Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:1-34.
223. Papa, F. R. and M. Hochstrasser. 1993. The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. Nature **366**:313-319.

224. **Papa, F. R., A. Y. Amerik, and M. Hochstrasser.** 1999. Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* **10**:741-756.
225. **Park, H. and A. T. Bakalinsky.** 2000. *SSUI* mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:881-888.
226. **Perdomo G.** 1999. Regulación de la nitrato y nitrito reductasa en la levadura *Hansenula polymorpha*. Expresión heteróloga de la nitrato reductasa de *Nicotiana tabacum* (Tesis Doctoral). Bioquímica y Biología Molecular: La Laguna.
227. **Perez, M. D., C. Gonzalez, J. Avila, N. Brito, and J. M. Siverio.** 1997. The *YNT1* gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes *YNII* and *YNRI* encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochem J* **321(Pt 2)**:397-403.
228. **Perez-Valle, J., H. Jenkins, S. Merchan, V. Montiel, J. Ramos, S. Sharma, R. Serrano, and L. Yenush.** 2007. Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell. Biol.* **27**:5725-5736.
229. **Perez-Valle, J., J. Rothe, C. Primo, M. Martinez Pastor, J. Arino, A. Pascual-Ahuir, J. M. Mulet, R. Serrano, and L. Yenush.** 2010. Hal4 and Hal5 protein kinases are required for general control of carbon and nitrogen uptake and metabolism. *Eukaryot. Cell* **9**:1881-1890.
230. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
231. **Pfanz, H., E. Martinoia, O. L. Lange, and U. Heber.** 1987. Flux of SO₂ into leaf cells and cellular acidification by SO₂. *Plant Physiology* **85**:928-933.
232. **Pilot, G., F. Gaymard, K. Mouline, I. Cherel, and H. Sentenac.** 2003. Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* **51**:773-787.
233. **Platt, A., T. Langdon, H. N. Arst, D. Kirk, D. Tollervey, J. M. Sanchez, and M. X. Caddick.** 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.
234. **Posas, F., M. Camps, and J. Ario.** 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**:13036-13041.
235. **Powlson, D. S., T. M. Addiscott, N. Benjamin, K. G. Cassman, T. M. de Kok, H. van Grinsven, J. L. L'Hirondel, A. A. Avery, and C. van Kessel.** 2008. When does nitrate become a risk for humans? *J Environ Qual* **37**:291-295.
236. **Prakash, D., H. Hinze, and H. Holzer.** 1986. Synergistic effect of m-chloro-peroxybenzoic acid, sulfite and nitrite on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **34**:305-308.
237. **Prista, C., J. C. Gonzalez-Hernandez, J. Ramos, and M. C. Loureiro-Dias.** 2007. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **153**:3034-3043.

Q

238. **Quesada, A., A. Galvan, and E. Fernandez.** 1994. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **5**:407-419.
239. **Quesada, A., A. Galvan, R. A. Schnell, P. A. Lefebvre, and E. Fernandez.** 1993. Five nitrate assimilation-related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* **240**:387-394.
240. **Quintero, F. J. and M. R. Blatt.** 1997. A new family of K⁺ transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. *FEBS Lett* **415**:206-211.

R

241. **Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz, and H. Riezman.** 1993. End3 and End4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **120**:55-65.
242. **Rechsteiner, M. and S. W. Rogers.** 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**:267-271.
243. **Reneke, J. E., K. J. Blumer, W. E. Courchesne, and J. Thorner.** 1988. The carboxy-terminal segment of the yeast alpha-factor receptor is a regulatory domain. *Cell* **55**:221-234.
244. **Rexach, J., E. Fernandez, and A. Galvan.** 2000. The *Chlamydomonas reinhardtii* Nar1 gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *Plant Cell* **12**:1441-1454.
245. **Rexach, J., B. Montero, E. Fernandez, and A. Galvan.** 1999. Differential regulation of the high affinity nitrite transport systems III and IV in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **274**:27801-27806.
246. **Rockel, P., F. Strube, A. Rockel, J. Wildt, and W. M. Kaiser.** 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* **53**:103-110.
247. **Rodriguez, C., P. Tejera, B. Medina, R. Guillen, A. Dominguez, J. Ramos, and J. M. Siverio.** 2010. Ure2 is involved in nitrogen catabolite repression and salt tolerance via Ca²⁺ homeostasis and calcineurin activation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.* **285**:37551-37560.
248. **Rodriguez-Navarro, A.** 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**:1-30.
249. **Rodriguez-Navarro, A., M. R. Blatt, and C. L. Slayman.** 1986. A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* **87**:649-674.
250. **Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner.** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**:364-368.
251. **Roomans, G. M., F. Blasco, and G. W. Borst-Pauwels.** 1977. Cotransport of phosphate and sodium by yeast. *Biochim Biophys Acta* **467**:65-71.

252. **Rose, M. and D. Botstein.** 1983. Construction and use of gene fusions to lacZ ([beta]-galactosidase) that are expressed in yeast, p. 167-180. *In* L. G. K. M. Ray Wu (ed.), *Methods in Enzymology Recombinant DNA Part C.* Academic Press.
253. **Roth, A. F., D. M. Sullivan, and N. G. Davis.** 1998. A Large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *J. Cell Biol.* **142**:949-961.
254. **Rubio, F., G. E. Santa-Maria, and A. Rodriguez-Navarro.** 2000. Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum* **109**:34-43.
255. **Rubio, L., A. Linares-Rueda, M. J. Garcia-Sanchez, and J. A. Fernandez.** 2005. Physiological evidence for a sodium-dependent high-affinity phosphate and nitrate transport at the plasma membrane of leaf and root cells of *Zostera marina* L. *J. Exp. Bot.* **56**:613-622.

S

256. **Sakamoto, A., S. Tsukamoto, H. Yamamoto, M. Ueda-Hashimoto, M. Takahashi, H. Suzuki, and H. Morikawa.** 2003. Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant J* **33**:841-851.
257. **Sakihama, Y., S. Nakamura, and H. Yamasaki.** 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative no production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* **43**:290-297.
258. **Sambrook, J. y Russell, D.W.** 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
259. **Sanda, S., T. Leustek, M. J. Theisen, R. M. Garavito, and C. Benning.** 2001. Recombinant *Arabidopsis* SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *J. Biol. Chem.* **276**:3941-3946.
260. **Santa-Maria, G. E., F. Rubio, J. Dubcovsky, and A. Rodriguez-Navarro.** 1997. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* **9**:2281-2289.
261. **Sarver, A. and J. DeRisi.** 2005. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **16**:4781-4791.
262. **Schachtman, D. P.** 2000. Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1465**:127-139.
263. **Schachtman, D. P., J. I. Schroeder, W. J. Lucas, J. A. Anderson, and R. F. Gaber.** 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KATI* cDNA. *Science* **258**:1654-1658.
264. **Scharff, A. M., H. Egsgaard, P. E. Hansen, and L. Rosendahl.** 2003. Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea root nodules by in vivo ¹⁵N Nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiology* **131**:367-378.

265. **Schimz, K. L. and H. Holzer.** 1979. Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. Arch Microbiol **121**:225-229.
266. **Schinko, T., H. Berger, W. Lee, A. Gallmetzer, K. Pirker, R. Pachlinger, I. Buchner, T. Reichenauer, U. Guldener, and J. Strauss.** 2010. Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. Mol Microbiol **78**:720-738.
267. **Schmidt, A., T. Beck, A. Koller, J. Kunz, and M. N. Hall.** 1998. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates *NPR1* and inhibits turnover of the tryptophan permease. EMBO J **17**:6924-6931.
268. **Segonzac, C., J. C. Boyer, E. Ipotesi, W. Szponarski, P. Tillard, B. Touraine, N. Sommerer, M. Rossignol, and R. Gibrat.** 2007. Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. Plant Cell **19**:3760-3777.
269. **Sengupta, S., M. S. Shaila, and G. R. Rao.** 1996. Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. Biochem J **317** (Pt 1):147-155.
270. **Sengupta, S., M. Subbarao Shaila, and G. R. Rao.** 1997. A novel autophosphorylation mediated regulation of nitrite reductase in *Candida utilis*. FEBS Lett **416**:51-56.
271. **Sengupta, S., M. Subbarap Shaila, and G. R. Rao.** 1997. In vitro and in vivo regulation of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. Arch Microbiol **168**:215-224.
272. **Sentenac, H., N. Bonneaud, M. Minet, F. Lacroute, J. M. Salmon, F. Gaymard, and C. Grignon.** 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. Science **256**:663-665.
273. **Seron, K., M. O. Blondel, R. Haguenaer-Tsapis, and C. Volland.** 1999. Uracil-induced down-regulation of the yeast uracil permease. J. Bacteriol. **181**:1793-1800.
274. **Shaw, J. D., K. B. Cummings, G. Huyer, S. Michaelis, and B. Wendland.** 2001. Yeast as a model system for studying endocytosis. Exp Cell Res **271**:1-9.
275. **Shibagaki, N., A. Rose, J. P. McDermott, T. Fujiwara, H. Hayashi, T. Yoneyama, and J. P. Davies.** 2002. Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1.2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. Plant J **29**:475-486.
276. **Siverio, J. M.** 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. FEMS Microbiol Rev **26**:277-284.
277. **Smith, F. W., P. M. Ealing, M. J. Hawkesford, and D. T. Clarkson.** 1995. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. PNAS **92**:9373-9377.
278. **Snell, F. D. and C. T. Snell.** 1949. Colorimetric methods of analysis. New York: Van Nostrand.
279. **Soetens, O., J. O. De Craene, and B. Andre.** 2001. Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. J. Biol. Chem. **276**:43949-43957.
280. **Soldatenkov, V. A., J. A. Velasco, M. A. Avila, A. Dritschilo, and V. Notario.** 1995. Isolation and characterization of SpTRK, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K⁺ transporter protein. Gene **161**:97-101.

281. **Stanbrough, M. and B. Magasanik.** 1995. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:94-102.
282. **Stanbrough, M., D. W. Rowen, and B. Magasanik.** 1995. Role of the GATA factors Gln3p and Nll1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *PNAS* **92**:9450-9454.
283. **Stankovich, M., A. Platt, M. X. Caddick, T. Langdon, P. M. Shaffer, and H. N. Arst.** 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.
284. **Staub, O. and D. Rotin.** 2006. Role of Ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* **86**:669-707.
285. **Stratford, M. A. L. C. and A. H. Rose.** 1986. Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **132**:1-6.
286. **Sullivan, J. A., M. J. Lewis, E. Nikko, and H. R. B. Pelham.** 2007. Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Rsp5 to membrane proteins in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* **18**:2429-2440.
287. **Swaminathan, S., A. Y. Amerik, and M. Hochstrasser.** 1999. The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**:2583-2594.
288. **Sze, H., S. Padmanaban, F. Cellier, D. Honys, N. H. Cheng, K. W. Bock, G. Conejero, X. Li, D. Twell, J. M. Ward, and K. D. Hirschi.** 2004. Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K^+ homeostasis in pollen development. *Plant Physiology* **136**:2532-2547.

T

289. **Tao, Y. and G. A. Marzluf.** 1999. The *NIT2* nitrogen regulatory protein of *Neurospora*: expression and stability of nit-2 mRNA and protein. *Curr Genet* **36**:153-158.
290. **Taylor, S. L., N. A. Higley, and R. K. Bush.** 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv Food Res* **30**:1-76.
291. **Tomatsu, H., J. Takano, H. Takahashi, A. Watanabe-Takahashi, N. Shibagaki, and T. Fujiwara.** 2007. An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *PNAS* **104**:18807-18812.
292. **Tong, Y., J. J. Zhou, Z. Li, and A. J. Miller.** 2005. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J* **41**:442-450.
293. **Truper, H. G. and U. Fischer.** 1982. Anaerobic oxidation of sulphur compounds as electron donors for bacterial photosynthesis. *Phil Trans R Soc B* **298**:529-542.
294. **Tsay, Y. F., C. C. Chiu, C. B. Tsai, C. H. Ho, and P. K. Hsu.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* **581**:2290-2300.

295. **Tsay, Y. F., J. I. Schroeder, K. A. Feldmann, and N. M. Crawford.** 1993. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**:705-713.
296. **Turner, R. J., D. E. Taylor, and J. H. Weiner.** 1997. Expression of *Escherichia coli* TehA gives resistance to antiseptics and disinfectants similar to that conferred by multidrug resistance efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:440-444.

U

297. **Unkles, S. E., R. Wang, Y. Wang, A. D. M. Glass, N. M. Crawford, and J. R. Kinghorn.** 2004. Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. *J. Biol. Chem.* **279**:28182-28186.
298. **Unkles, S. E., D. A. Rouch, Y. Wang, M. Y. Siddiqi, A. D. M. Glass, and J. R. Kinghorn.** 2004. Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter. *PNAS* **101**:17549-17554.

V

299. **Van Helden, J.** 2003. Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3593-3596.
300. **Vargas, R. C., R. Garcia-Salcedo, S. Tenreiro, M. C. Teixeira, A. R. Fernandes, J. Ramos, and I. Sa-Correia.** 2007. *Saccharomyces cerevisiae* Multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells. *Eukaryot. Cell* **6**:134-142.
301. **Vasudevan, S. G., W. L. Armarego, D. C. Shaw, P. E. Lilley, N. E. Dixon, and R. K. Poole.** 1991. Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **226**:49-58.
302. **Volland, C., D. Urban-Grimal, G. Geraud, and R. Haguenaer-Tsapis.** 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* **269**:9833-9841.

W

303. **Walch-Liu, P., G. Neumann, F. Bangerth, and C. Engels.** 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J. Exp. Bot.* **51**:227-237.
304. **Walter, E. G. and D. E. Taylor.** 1989. Comparison of tellurite resistance determinants from the IncP alpha plasmid RP4Ter and the IncHII plasmid pHH1508a. *J. Bacteriol.* **171**:2160-2165.
305. **Wang, G., J. M. McCaffery, B. Wendland, S. Dupre, R. Haguenaer-Tsapis, and J. M. Huibregtse.** 2001. Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **21**:3564-3575.
306. **Wang, Y. H., D. F. Garvin, and L. V. Kochian.** 2002. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiology* **130**:1361-1370.

307. **Wang, Y., W. Li, Y. Siddiqi, J. R. Kinghorn, S. E. Unkles, and A. D. Glass.** 2007. Evidence for post-translational regulation of NrtA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrate transporter. *New Phytol* **175**:699-706.
308. **Wells, K. M. and R. Rao.** 2001. The Yeast Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1 Is an N-linked glycoprotein. Topological implications. *J. Biol. Chem.* **276**:3401-3407.
309. **Williams, S. J., R. H. Senaratne, J. D. Mougous, L. W. Riley, and C. R. Bertozzi.** 2002. 5'-adenosinephosphosulfate lies at a metabolic branch point in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **277**:32606-32615.
310. **Wirth, J., F. Chopin, V. Santoni, G. Viennois, P. Tillard, A. Krapp, L. Lejay, F. niel-Vedele, and A. Gojon.** 2007. Regulation of root nitrate uptake at the *NRT2.1* protein level in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **282**:23541-23552.
311. **Wong, K. H., M. J. Hynes, and M. A. Davis.** 2008. Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryot. Cell* **7**:917-925.
312. **Wray, J. L.** 1989. Molecular and genetic aspects of nitrite reduction in higher plants, p. 244-262. Oxford Science Publications, Oxford.

X

313. **Xiao, X., Y. H. Fu, and G. A. Marzluf.** 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**:8861-8868.
314. **Xu, J., H. D. Li, L. Q. Chen, Y. Wang, L. L. Liu, L. He, and W. H. Wu.** 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter *AKT1* in *Arabidopsis*. *Cell* **125**:1347-1360.
315. **Xu, X., J. D. Wightman, B. L. Geller, D. Avram, and A. T. Bakalinsky.** 1994. Isolation and characterization of sulfite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **25**:488-496.

Y

316. **Yashiroda, H., D. Kaida, A. Toh-e, and Y. Kikuchi.** 1998. The PY-motif of Bul1 protein is essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various stress conditions. *Gene* **225**:39-46.
317. **Yashiroda, H., T. Oguchi, Y. Yasuda, E. Toh, and Y. Kikuchi.** 1996. Bul1, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3255-3263.
318. **Yenush, L., J. M. Mulet, J. Arino, and R. Serrano.** 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**:920-929.
319. **Yenush, L., S. Merchan, J. Holmes, and R. Serrano.** 2005. pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **25**:8683-8692.

320. Yuan, G. F., Y. H. Fu, and G. A. Marzluf. 1991. nit-4, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **11**:5735-5745.

Z

321. Zaman, S., S. I. Lippman, X. Zhao, and J. R. Broach. 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**:27-81.
322. Zhao, X. J., D. Raitt, V. Burke, A. S. Clewell, K. E. Kwast, and R. O. Poyton. 1996. Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* **271**:25131-25138.
323. Zhou, J. J., E. Fernandez, A. Galvan, and A. J. Miller. 2000. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Lett* **466**:225-227.
324. Zhou, J. J., F. L. Theodoulou, I. Muldin, B. Ingemarsson, and A. J. Miller. 1998. Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *J. Biol. Chem.* **273**:12017-12023.
325. Zhou, J. J., L. J. Trueman, K. J. Boorer, F. L. Theodoulou, B. G. Forde, and A. J. Miller. 2000. A high affinity fungal nitrate carrier with two transport mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**:39894-39899.

VIII. APÉNDICES

VIII. APÉNDICE.

APÉNDICE I. Cepas de *Hansenula polymorpha* empleadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo	Origen
WT*	<i>NCYC495leu2::p18B1(LEU2) ura3::pBSURA3(URA3)</i>	NCYC ¹
<i>Δynt1</i>	<i>Δynt1::URA3</i>	GMN ²
<i>Δynr1</i>	<i>Δynr1::URA3</i>	GMN
<i>Δyni1</i>	<i>Δyni1::URA3</i>	GMN
<i>Δgat1</i>	<i>Δgat1::URA3</i>	GMN
FN0002	<i>Ynt1</i> ^{Δ232-286}	GMN
FN0003	<i>Ynt1</i> ^{K243R, K253R, K270R}	GMN
FN0014	<i>Ynt1</i> ^{S244A, S246A, S252A}	GMN
FN00LE-1	<i>Δynt1::URA3 leu2::pNT1 (P_{YNT1}-LEU2) clones 1 y 2</i>	GMN
FN12003	<i>Δynr1::URA3 leu2::pGPβ1 (P_{YNR1}-lacZ HpLEU2)</i>	GMN
FN32003	<i>Δynt1::Δura3 Δynr1::URA3 leu2::pGPβ1 (P_{YNR1}-lacZ HpLEU2)</i>	GMN
YM0100	<i>Δnpr1::LEU2</i>	GMN
YM1000	<i>Δynt1::URA3 leu2::pYNR(Ex)TbNRT2 (P_{YNR1}TbNRT2 HpLEU2)</i>	GMN
YM0800	<i>Δhak1::LEU2</i>	GMN
YM0900	<i>Δtrk1::URA3</i>	GMN
YM1000	<i>Δhak1::LEU2 Δtrk1::URA3</i>	GMN
YM1001	<i>rsp5-1::URA3 HAK1-6HA (ble)</i>	GMN
YM0300	<i>nNPR1LEU2</i>	GMN
CR3001	<i>Δcnb1::URA3</i>	GMN
CR3004	<i>Δcrz1::URA3</i>	GMN
EC0010	<i>Δssu1::URA3</i>	Este trabajo
EC0012	<i>Δssu2::ble</i>	Este trabajo
EC0014	<i>Δssu1::URA3 Δssu2::ble</i>	Este trabajo
EC0016	<i>Δssu2::ble leu2::pSSU2-LEU2(nSSU2)</i>	Este trabajo
EC0018	<i>Δssu1::URA3 leu2::pSSU1-LEU2(nSSU1)</i>	Este trabajo
EC0020	<i>Δynt1::URA3 Δssu2::ble</i>	Este trabajo
EC0022	<i>Δynr1::URA3 Δssu2::ble</i>	Este trabajo
EC0024	<i>Δynr1::URA3 leu2::pSSU2-LEU2 (nSSU2)</i>	Este trabajo
EC0026	<i>Δynr1:: LEU2 Δssu1::URA3 Δssu2::bleo</i>	Este trabajo
EC0028	<i>Δyni1::URA3 Δssu2::bleo</i>	Este trabajo
EC0030	<i>Δyni1::URA3 leu2::pSSU2-LEU2 (nSSU2)</i>	Este trabajo
EC0032	<i>Δssu2::bleo Δynr1::URA3 leu2::pGPβ1 (P_{YNR1}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo

EC0034	<i>NCYC495:: leu2::pSSU2-lacZ (P_{SSU2}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0036	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2::pSSU2-lacZ (P_{SSU2}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0038	<i>Δ_{ssu2}::ble leu2::pSSU2-lacZ (P_{SSU2}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0040	<i>SSU2-GFP SSU2-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0042.1	<i>Δ_{ssu2}::ble leu2::pScSSU1 (P_{SSU2}-ScSSU1 HpLEU2)</i> clones 1,1	Este trabajo
EC0042.4	<i>Δ_{ssu2}::ble leu2::pScSSU1 (P_{SSU2}-ScSSU1 HpLEU2)</i> clon 1,4	Este trabajo
EC0044	<i>NCYC495::leu2::pScSSU1 (P_{SSU2}-ScSSU1 HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0046.10	<i>Δ_{ynr1}::neo Δ_{ssu2}::ble leu2:: pScSSU1 (P_{SSU2}-ScSSU1 HpLEU2)</i> clon 10	Este trabajo
EC0046.23	<i>Δ_{ynr1}::neo ssu2::ble leu2::pScSSU1 (P_{SSU2}-ScSSU1 HpLEU2)</i> clon 23	Este trabajo
EC0048.1	<i>Δ_{gat1}::URA3 leu2 pSSU2-LEU2 (HpLEU2)</i> clon 1	Este trabajo
EC0048.2	<i>Δ_{gat1}::URA3 leu2 pSSU2-LEU2 (HpLEU2)</i> clon 2	Este trabajo
EC0048.3	<i>Δ_{gat1}::URA3 leu2 pSSU2-LEU2 (HpLEU2)</i> clon 3	Este trabajo
EC0048.4	<i>Δ_{gat1}::URA3 leu2 pSSU2-LEU2 (HpLEU2)</i> clon 4	Este trabajo
EC0050	<i>Δ_{gat1}::URA3 leu2 pSSU2-lacZ (P_{SSU2}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0100	<i>NCYC495::leu2::pHAK1-lacZ (P_{HAK1}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0120	<i>Δ_{gat1}::URA3 leu2:: pHAK1-lacZ (P_{HAK1}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0130	<i>Δ_{gat2}::URA3 leu2:: pHAK1-lacZ (P_{HAK1}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0140	<i>Δ_{npr1}::URA3 leu2:: pHAK1-lacZ (P_{HAK1}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0200	<i>NCYC495 HAK1-HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0210	<i>Δ_{end4}::URA3 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0220	<i>Δ_{pep12}::LEU2 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0230	<i>Δ_{vps27}::URA3 HAK1-6HA (ble) 1</i>	Este trabajo
EC0240	<i>Δ_{npr1}::URA3 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0250	<i>nNPR1LEU2 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0260	<i>Δ_{gat1}::URA3 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0270	<i>Δ_{gat2}::URA3 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0280	<i>Δ_{cnb1}::URA3 HAK1-6HA (ble)</i>	Este trabajo
EC0290	<i>NCYC495 HAK1-GFP (ble)</i>	Este trabajo
EC0300.1	<i>NCYC495 leu2:: pTYNT0 (P_{YNT1}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 1	Este trabajo
EC0300.2	<i>NCYC495 leu2:: pTYNT0 (P_{YNT1}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 2	Este trabajo
EC0300.3	<i>NCYC495 leu2:: pTYNT0 (P_{YNT1}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 3	Este trabajo
EC0300.4	<i>NCYC495 leu2:: pTYNT0 (P_{YNT1}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 4	Este trabajo

EC0300.5	<i>NCYC495 leu2:: pTYNT0 (P_{YNTI}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 5	Este trabajo
EC0310.1	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2:: pTYNT0 (P_{YNTI}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 1	Este trabajo
EC0310.2	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2:: pTYNT0 (P_{YNTI}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 2	Este trabajo
EC0310.3	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2:: pTYNT0 (P_{YNTI}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 3	Este trabajo
EC0310.4	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2:: pTYNT0 (P_{YNTI}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 4	Este trabajo
EC0310.5	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2:: pTYNT0 (P_{YNTI}-LEU2 HpLEU2)</i> clon 5	Este trabajo
EC0320	<i>NCYC495::leu2::pGPβ5 (P_{YNII}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0330	<i>Ynt1^{Δ232-286} leu2::pGPβ5 (P_{YNII}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0340	<i>Δ_{ynt1}::URA3 leu2::pGPβ5 (P_{YNII}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0350	<i>Δ_{ynr1}::URA3 leu2::pGPβ5 (P_{YNII}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0360	<i>Δ_{ynt1}::Δ_{ura3} Δ_{ynr1}::URA3 leu2::pGPβ5 (P_{YNII}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo
EC0370	<i>Δ_{yni1}::URA3 leu2::pGPβ5 (P_{YNII}-lacZ HpLEU2)</i>	Este trabajo

(cepas *LEU2 URA3* excepto cuando se indique lo contrario)

NCYC¹: "National Collection of Yeast Cultures".

GMN²: Grupo del Metabolismo del Nitrógeno.

Descripción del genotipo de las cepas bacterianas utilizadas.

<i>ara</i>	Su mutación causa incapacidad para crecer en arabinosa.
<i>dam</i>	ADN adenina metilasa. Los mutantes no pueden metilar la adenina de la secuencia GATC.
<i>dcm</i>	ADN citosina metilasa. Los mutantes no pueden metilar la citosina de las secuencias C*CAGG y C*CTGG.
<i>deoR</i>	Represor del operón deo. Este operón está implicado en el catabolismo de nucleósidos.
<i>end4</i>	Endonucleasa I específica de ADN. 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>	Subunidad A de la ADN girasa; mutación <i>gyrA96</i> confiere resistencia a ácido naladixico.
<i>hsdR</i>	Codifica la enzima de restricción EcoK I. La mutación en este gen permite la

	propogación en <i>E. coli</i> de ADN procedente de otros organismo.
<i>lacI</i>	Proteína represora del operón lac. Controla la expresión de promotores que portan el operador lac; el IPTG se une al represor lac y desreprime al promotor.
<i>lacY</i>	Utilización de lactosa, permeasa de galactosa.
<i>lacZ</i>	β -D-galactosidasa; utilización de lactosa. La mutación en <i>lacZ</i> produce colonias blancas en presencia de X-gal.
<i>lacZDM15</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 pBlueescript o lambda ZAP II para producir una β -D-galactosidasa funcional.
<i>leu</i>	Su mutación hace que se requiera leucina para crecer.
<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>rpsL</i>	Proteína S12 de la subunidad 30S del ribosoma. Su mutación confiere resistencia a estreptomicina.
<i>supE</i>	Supresor de mutaciones ámbar. Algunos fagos necesitan este gen mutado para crecer.
<i>Tet^r</i>	Resistencia a tetraciclina.
<i>thi-1</i>	Los mutantes requieren vitamina B1 (tiamina) para el crecimiento en medio mínimo.
<i>Tn10</i>	Transposón que normalmente porta el gen <i>Tet^r</i> .
<i>tonA</i>	Su mutación confiere resistencia a los bacteriófagos líticos T1, T5 y f80.
<i>traD36</i>	Previene la transferencia del episoma F'.
<i>tsx</i>	Confiere resistencia a los fagos T6 y colicina K.

APÉNDICE II. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características	Origen
pGEM-T Easy	Empleado para el clonaje de productos de PCR. <i>AmpR</i> , <i>lacZ</i>	Promega, EEUU
pBS	<i>pBluescript</i> KS (+). <i>AmpR</i>	Stratagene, EEUU
pBSURA3	Derivado de pBS portando un fragmento de 1.9 kpb del gen <i>HpURA3</i> . <i>AmpR</i>	GMN ²
p18B1	Derivado de pTZ18R (Farmacia). Contiene un fragmento de 2.5 kpb del gen <i>HpLEU2</i> . <i>AmpR</i> .	GMN
pGEMT-LEU2	Derivado de pGEM-T Easy portando la secuencia del gen <i>LEU2</i> . <i>AmpR</i> .	GMN
pGEMT-ble	Derivado de pGEM-T Easy portando el gen <i>ble</i> (confiere resistencia a zeocina). <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	GMN
pEYFP-N1	Contiene el gen <i>EYFP</i> . <i>KanR</i> , <i>NeoR</i> .	Clontech, EEUU
pGEMHE	Se usó para la síntesis de ARNm en <i>Xenopus</i> . Contiene 1098 pb que no se transcriben en la región 5' (5'UTR) y 279 pb en la región 3' (3'UTR). <i>AmpR</i> .	[166]
pHPI359	Derivado de Yep356. Tiene sustituido el gen <i>ScURA3</i> por un fragmento de 2.5 kpb conteniendo el gen <i>HpLEU2</i> . <i>AmpR</i> .	[34]
pGPβ5	Porta la fusión <i>P_{YNI}-lacZ</i> . Contiene 1520 pb de la región 5' no codificante del gen <i>YNI1</i> . <i>AmpR</i> .	GMN
pGPβ1	Contiene el gen <i>lacZ</i> bajo un fragmento de 0.9 kpb de la región 5' no codificante del gen <i>YNI1</i> . <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	GMN
pTYNT0	Derivado de pBS. Contiene el gen <i>YNT1</i> (ORF + 1.7 kpb y 0.5 kpb de las regiones 5' y 3' no codificantes). <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	GMN
pNRDURA3	Derivado del pBS. Contiene el fragmento para interrumpir el gen <i>YNI1</i> . <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> .	GMN
pNTB21	Derivado de pTYNT0. Contiene el fragmento de interrupción del gen <i>YNT1</i> . <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> .	GMN
pANL31	Derivado del pBS. Contiene el gen <i>eGFP</i> sin el codón de iniciación. <i>ZeoR</i> , <i>AmpR</i> .	[160]
pHA	Derivado de pANL31 al que se le ha sustituido el gen <i>eGFP</i> por un fragmento de PCR codificando 6 copias del epítipo HA. <i>ZeoR</i> , <i>AmpR</i> .	GMN
pGEMT-HAK1c	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene el gen <i>HAK1</i> (ORF + 1 kpb y 0.5 kpb de las regiones 5' y 3' no codificantes). <i>AmpR</i> .	GMN
pGEMT-HAK1gfp	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene el gen <i>HAK1</i> (ORF + 1 kpb de la región 5' no codificantes). <i>AmpR</i> .	GMN
pGEMT-SSU1	Derivado de pGEM-T Easy con 2.8 kpb del gen <i>SSU1</i> . <i>AmpR</i>	Este trabajo
pGEMT-SSU2	Derivado de pGEM-T Easy con de 2.8 kpb del gen <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i>	Este trabajo
pGEMT-kanMX	Derivado de pGEM-T Easy que contiene 1.8 kpb del gen <i>neo</i> (confiere resistencia a G418). <i>AmpR</i> , <i>KanR</i> , <i>NeoR</i>	Este trabajo
pGEMT-P_{SSU2}	Derivado de pGEMT-Easy. Contiene 1 kpb de la región 5' no codificante más 51 pb de la región 5' codificante del gen <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pGEMT-P_{SSU2I}	pGEMT-Easy contiene 1 kpb de la región 5' no codificante más 61 pb de la región 5' no codificante del gen <i>SSU2</i> con dianas <i>BamHI</i> y <i>BglII</i> en sus extremos. <i>AmpR</i> .	Este trabajo

pGEMT-ScSSU1	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene 1.8 kpb del gen <i>ScSSU1</i> sin el codón de iniciación (ORF + 503 pb de la región 3' no codificante). <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pP_{SSU2I}-ScSSU1	Derivado de pGEMT-P _{SSU2I} . Expresa el gen <i>ScSSU1</i> bajo el control de un fragmento de 1 kpb de la región 5' no codificante del gen <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pP_{SSU2I}-ScSSU1LEU2	Derivado de pP _{SSU2I} -ScSSU1 al que se le añadió el gen <i>LEU2</i> . <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	Este trabajo
pGEMT-SSU2_{orf}	Derivado de pGEM-T Easy que contiene la ORF de <i>SSU2</i> flanqueada por dos dianas <i>BglII</i> . <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pGEMT-P_{HAK1}	Contiene 1081 pb de la región 5' no codificante más 40 pb de la región 5' codificante del gen <i>HAK1</i> en pGEM-T Easy. <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pGEMT-P_{TRK1}	Contiene 1011 pb de la región 5' no codificante más 40 pb de la región 5' codificante del gen <i>TRK1</i> . <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pGEMT-yeGFP	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene el gen <i>yeGFP</i> sin codón de inicio y con una secuencia espaciadora en 5'. <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pGEMT-EYFP	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene el gen <i>EYFP</i> sin codón de inicio y con una secuencia espaciadora en 5'. <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pGEMT-RedStart	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene el gen <i>RedStart</i> sin codón de inicio y con una secuencia espaciadora en 5'. <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pSSU2-LEU2	Derivado de pGEMT-SSU2 al que se le añadió el gen <i>LEU2</i> . <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	Este trabajo
pSSU2-URA3	Derivado de pBSURA3. Contiene el gen <i>SSU2</i> (ORF + 1008 pb y 682 pb de las regiones 5' y 3' no codificantes). <i>AmpR</i> , <i>URA3</i>	Este trabajo
pSSU1-LEU2	Derivado de p18B1 al que se le añadió el gen <i>SSU1</i> (ORF + 905 pb y 795 pb de las regiones 5' y 3' no codificantes). <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	Este trabajo
pSSU2-HA	Derivado de pHA en el que se ha introducido en fase con 6xHA un fragmento de <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pSSU2-eGFP	Derivado de pANL31 en el que se ha introducido en fase con <i>eGFP</i> un fragmento de <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pSSU2-EYFP	Derivado de pEYFP-N1 en el que se ha introducido en fase con <i>EYFP</i> un fragmento de <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pXeSSU2YFP	Derivado de pGEMHE que porta el gen <i>SSU2</i> fusionado al gen <i>EYFP</i> . Este fragmento se obtuvo por digestión del plásmido pSSU2-EYFP con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i> . <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pyeGFP	Derivado de pANL31 al que se le ha sustituido el gen <i>eGFP</i> por el gen <i>yeGFP</i> . <i>ZeoR</i> , <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pEYFP	Derivado de pANL31 al que se le ha sustituido el gen <i>eGFP</i> por el gen <i>EYFP</i> . <i>ZeoR</i> , <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pRedSart	Derivado de pANL31 al que se le ha sustituido el gen <i>eGFP</i> por el gen <i>RedStart</i> . <i>ZeoR</i> , <i>AmpR</i> .	Este trabajo
pHAK1-HA	Derivado de pHA en el que se ha introducido en fase con 6xHA un fragmento de <i>HAK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pHAK1-GFP	Derivado de pANL31 en el que se ha introducido en fase con <i>eGFP</i> un fragmento de <i>HAK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pHAK1-yeGFP	Derivado de pyeGFP en el que se ha introducido en fase con <i>yeGFP</i> un fragmento de <i>HAK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pHAK1-EYFP	Derivado de pEYFP en el que se ha introducido en fase con <i>EYFP</i> un fragmento de <i>HAK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo

pHAK1-RedStart	Derivado de pRedStart en el que se ha introducido en fase con <i>RedStart</i> un fragmento de <i>HAK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pΔssu1URA3	Derivado de pGEMT-SSU1 que porta el fragmento de interrupción de <i>SSU1</i> con <i>URA3</i> . <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> .	Este trabajo
pΔssu2ble	Derivado de pGEMT-SSU2 que porta el fragmento de interrupción de <i>SSU2</i> con el gen <i>ble</i> . <i>AmpR</i> , <i>ZeoR</i> .	Este trabajo
pNRDkanMX	Derivado de pNRDURA3 al que se le ha sustituido el gen <i>URA3</i> por el gen <i>neo</i> . <i>AmpR</i> , <i>NeoR</i> .	Este trabajo
pP_{SSU2}-lacZ	Derivado de pHPI359. Expresa el gen <i>lacZ</i> bajo el control de un fragmento de 1051 pb de la región 5' no codificante del gen <i>SSU2</i> . <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	Este trabajo
pP_{HAK1}-lacZ	Derivado de pHPI359. Expresa el gen <i>lacZ</i> bajo el control de un fragmento de 1080 pb de la región 5' no codificante del gen <i>HAK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	Este trabajo
pP_{TRK1}-lacZ	Derivado de pHPI359. Expresa el gen <i>lacZ</i> bajo el control de un fragmento de 1011 pb de la región 5' no codificante del gen <i>TRK1</i> . <i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> .	Este trabajo

GMN²: Grupo del Metabolismo del Nitrógeno

APÉNDICE III. Oligos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Utilidad
SSU1-F	TTTGACCAGCTTCTTGAGGA	Interrupción de <i>SSU1</i>
SSU1-R	AAAGCCAAGTACGATGCTGA	Interrupción de <i>SSU2</i>
SSU1int- F	CCACATGAGCGAAACACAACCT	Confirmación de la interrupción de <i>SSU1</i>
Ura3 ext II-F	TGGATATTGGATTGCAAGCAG	Confirmación de la interrupción de <i>SSU1</i>
SSU2-F	TCCCTTCCTGAGTGTATGGCA	Interrupción de <i>SSU2</i>
SSU2-R	TGCGGATGGTATACACGAAA	Interrupción de <i>SSU2</i>
SSU2int-R	ACAATACGAGCGCAAACCTAGA	Confirmación de la interrupción de <i>SSU2</i>
ZeoC-R	TATCGACAAAGGAAAAGGGG	Confirmación de la interrupción de <i>SSU2</i>
kanMX-F	AGGCCTACTTGAACGGATCCACTAGCT	Amplificación del gen <i>kanMX</i> con cola <i>StuI</i>
kanMX-R	AGGCCTTTCTTTCTCCTGCGTTATCCCCT	Amplificación del gen <i>kanMX</i> con cola <i>StuI</i>
NCYC1-F	GCAGCAATGATACAT	Obtención del fragmento de interrupción de <i>YNR1</i>
NCYC1-R	TATCCAACCTTGCGCG	Obtención del fragmento de interrupción de <i>YNR1</i>
SSU2Prom-F	GGATCCTCTCCCTTCCTGAGTGTATGG	Fusión del promotor de <i>SSU2</i> a <i>lacZ</i> y a <i>ScSSU1</i>
SSU2Prom-R	GATGCACGGAGGCACCGTCGTCTCGG	Fusión del promotor de <i>SSU2</i> a <i>lacZ</i>
PromSSU2-R	AGATCTATGGTTGCCAATTGGGTA	Fusión del promotor de <i>SSU2</i> a <i>ScSSU1</i>
ScSSU1-F	AGATCTATGGTTGCCAATTGGGTA	Amplificación del gen <i>ScSSU1</i> con cola <i>BglIII</i>
ScSSU1ter-R	GGATCCTGCTAAACGCGTAAAATCTA	Amplificación del gen <i>ScSSU1</i> con cola <i>BamHI</i>
SSU2orf-F	AGATCTATGGCATCTTCTCTCTCATC	Amplificación de la ORF de <i>SSU2</i> con cola <i>BglIII</i>
SSU2orf-R	AGATCTGACGTCATGCTTTTGAATAG	Amplificación de la ORF de <i>SSU2</i> con cola <i>BglIII</i>
tag-R	AGAGGTCGACGTGAATGATCGTTCCACTT TT	Confirmación de la fusión a HA
G2	ATGAACTTCAGGGTCAGCTTG	Confirmación de la fusión a GFP
SSU2orf II-F	GAATTCATGGCATCTTCTCTCTCATC	Amplificación de la ORF de <i>SSU2</i> con cola <i>EcoRI</i>
SSU2orf II-R	GTCGACACGTCATGCTTTTGAATAGG	Amplificación de la ORF de <i>SSU2</i> con cola <i>SalI</i>
ProHAK1-F	GGATCCGGAACATGTGCGGACCAG	Fusión del promotor de <i>HAK1</i> a <i>lacZ</i>

ProHAK1-R	AAGCTTCTCCATAGATGGCTCCC	Fusión del promotor de <i>HAK1</i> a <i>lacZ</i>
ProTRK1-F	GCATGCCAAAATATGAGAAAATCCG	Fusión del promotor de <i>TRK1</i> a <i>lacZ</i>
ProTRK1-R	GCATGCTTCGGCCAGGCATCTGT	Fusión del promotor de <i>TRK1</i> a <i>lacZ</i>
yeGFP-F	AGATCTGAACGCGGCCGCCAGCTGAA	Amplificación de <i>yeGFP</i> , <i>EYFP</i> y <i>Redstart</i> con cola <i>BglIII</i>
yeGFP-R	CTCGAGGGCGCGCAGTTATTTGTACA	Amplificación de <i>yeGFP</i> con cola <i>XhoI</i>
EYFP-R	CTCGAGGTGGCGCGCCCTAGCACTGA	Amplificación de <i>EYFP</i> con cola <i>XhoI</i>
RedStart-R	CTCGAGGGCGCGCCTTAATTAACCCG	Amplificación de <i>RedStart</i> con cola <i>BglIII</i>
Hak1gfp-R	GGATCCGATGGTAACACGGTTTCCCA	Amplificación de la ORF de <i>HAK1</i> con cola <i>BamHI</i> . Fusión a <i>RedStart</i>
Hak1-F	GGATCCCAAATTCACCTCTAGCCGTGT	Amplificación de la ORF de <i>HAK1</i> con cola <i>BamHI</i> . Fusión a <i>RedStart</i>
Q-SSU1- F	GGAATGGTGGCACTGTTTCT	qRT-PCR
Q-SSU1- R	TCCCAAAAACCGCGTAAATA	qRT-PCR
Q-SSU2- F	GCGTATTCCTTGGAGCAGAG	qRT-PCR
Q-SSU2- R	CGTGGAAGAAGCAACTGTCA	qRT-PCR
Q-HAK1-F	GTGGGAGCCATCTATGGAGA	qRT-PCR
Q-HAK1-R	CTGCCACCTTCGTTGTTAT	qRT-PCR
Q-TRK1-F	CACCAGAATTGGGAGACGTT	qRT-PCR
Q-TRK1-R	ATGGTTGTTGTCCAGGAGAG	qRT-PCR
Q-ACT1-F	GAGGTTACACGTTCTCCACCA	qRT-PCR
Q-ACT1-R	ACCTGTCAATCAGGCAACTC	qRT-PCR
ura3-f	GGTGAAGCATTAGGTCCC	Confirmación de copia única de <i>lacZ</i>
ura3-r	GCACAGTTAAGCCGC	Confirmación de copia única de <i>lacZ</i>
YNT1SEC-R	GCACATGTAGCAAAGTCC	Confirmación de la interrupción de <i>YNT1</i>
8Z	CGGAATTCACATGTGATAGGTT	Confirmación de la interrupción de <i>YNT1</i>