

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/15
I.S.B.N.: 978-84-15910-10-7

RAFAELA GONZÁLEZ MONTELONGO

**Identificación de nuevos sistemas
de transporte de nitrato/nitrito en la levadura
Hansenula polymorpha.
Caracterización de Nar1 y Chl1**

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) del Ministerio de Ciencia y Tecnología.y
BFU2007-60172/BMC (2007-2010) del Ministerio de Ciencia y Cultura.

Rafaela González ha sido becaria del proyecto Interreg III-B Germobanco Agrícola de la Macaronesia II y ha participado en calidad de auxiliar de laboratorio en los proyectos de investigación RTA2006-00187, RTA04-171-C2 y RF2007-00015-00-00 del INIA.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional y por su constante ayuda. Ojalá pudiera compensarles por tanto cariño, dedicación y paciencia. A mis hermanas, que han estado siempre en los mejores y en los peores momentos, les debo que esta tesis sea un hecho. Gracias Mary. Gracias Cris (que sí... que te quiero).

A mi director de tesis le agradezco que me admitiera en su grupo y me permitiera permanecer en él aún sabiendo que no obtendría beca. Gracias por darme la oportunidad de iniciar este proyecto en tú laboratorio.

Después de estos años en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular he tenido la oportunidad de conocer a algunos de mis mejores amigos. Trabajar aquí también me ha permitido formarme como investigadora y aumentar mi interés por la ciencia lo que agradezco enormemente a mis compañeros del grupo del metabolismo de nitrógeno y de los restantes laboratorios que me han enseñado, apoyado y guiado en este tiempo. Muchas gracias a todos por su colaboración las numerosas veces que la he necesitado. Por supuesto a mis compañeros de laboratorio porque sin duda es a ustedes a quién les debo todo lo que sé. Gracias a Fran Navarro, Braulio Medina, Rosa Guillén, Yuse Martín, Elisa Cabrera, Celia Rodríguez y Yelvis González por el tiempo que invirtieron en mi formación tan desinteresadamente.

Gracias a las Dras. Beatriz Rodríguez y Elena Rodríguez del Dpto. de Nutrición y Bromatología por su colaboración en la determinación de aminoácidos, así como al Dr. Rafael Galindo y a las becarias del Servicio de Espectroscopía de Absorción Atómica de la ULL por las determinaciones de calcio.

A mis amigas y compañeras del laboratorio de Fisiología Vegetal del ICIA, Dra. Yure Hernández, Eva Dorta, Dra. Mónica González y Dra. Gloria Lobos. Gracias chicas por todos los momentos que hemos compartido y por estar siempre a mi lado durante estos años. Gracias Mónica por creer en mí y permitirme publicar en tu grupo.

A mis compañeros del Dpto. de Botánica Aplicada del JAO: Miguel Padrón (gracias por presentarnos al grupo de amig@s de Adhara PaSeA). A los Drs. Alfredo Reyes, Rosana Guma, Arnoldo Santos por acogerme como a una más en el grupo y por brindarme la oportunidad de publicar con ustedes. Y por supuesto a mis artistas favoritos, Oscar Domínguez y Cecilio Massanet. Gracias por la amistad y la capacidad que tienen para arrancarme carcajadas incluso en los peores momentos. ¡¡Con ustedes la vida es fiesta!!

Gracias a la peña de Fisiología Animal (Jorge, Noe Fabelo, Lupe, Mercedes, Deiene, Noe Tejera, Virginia, Tomás, Miguel Molina, Marta, Cova, Jose, Mario Díaz, Irma, Ana, Marga, Pepa) por el cariño que me han dado siempre.

Gracias a la familia Guillén Fretes por su amistad y su amor. Gracias Sime por tus palabras de ánimo, sus buenos deseos y sobre todo por tratarme como a una hija más. A Rosa y Oscar sólo puedo darles las gracias, mil gracias por todo. Rojajiu. Sin duda soy afortunada por tenerlos como amigos y hermanos.

A Yanet, Jose, Anita y Galiano por sus preguntas, su interés, las charlas, las risas, el cariño... Gracias.

*No se enseña bien sino lo que se hace,
y quien no investiga no enseña a investigar.*

Santiago Ramón y Cajal

ÍNDICE DEL MANUSCRITO

Abreviaturas y símbolos	I
Resumen	II
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	39
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
IV. CONCLUSIONES	157
V. MATERIALES Y MÉTODOS	161
VI. APÉNDICES	231
VII. BIBLIOGRAFÍA	243

ÍNDICE DETALLADO

Abreviaturas y símbolos	I
Resumen	II
I. INTRODUCCIÓN	1
1. La vía de asimilación de nitrato en los seres vivos.....	1
2. Asimilación del nitrato en levaduras	4
2.1. Vía de asimilación del nitrato en <i>H. polymorpha</i>	5
2.2. Regulación de la vía de asimilación de nitrato.....	9
2.2.1. Regulación transcripcional: factores GATA, Ure2 y vía de las quinasas TOR	10
2.2.2. Regulación transcripcional: La vía calcineurina	12
3. Los transportadores de nitrato y nitrito.....	19
3.1. Familia NRT1 (PTR).....	22
3.2. Familia NRT2 (NNP).....	27
3.3. Familia FNT	30
4. Transporte de nitrato y nitrito en <i>H. polymorpha</i>	32
II. OBJETIVOS	39
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
1. Nar1 participa en la excreción de nitrato y de nitrito en <i>H. polymorpha</i>	45
1.1. El genoma de <i>H. polymorpha</i> codifica la proteína Nar1.....	45
1.1.1. <i>HpNARI</i> codifica el único transportador de la familia FNT en <i>H.</i> <i>polymorpha</i>	50
1.2. Caracterización de la proteína Nar1 de <i>H. polymorpha</i>	51
1.3. La cepa $\Delta nar1$ presenta baja actividad nitrato reductasa (NR).....	56
1.4. La cepa $\Delta nar1$ presenta alteraciones en la consumo de nitrato y nitrito.....	58
1.5. $\Delta nar1$ acumula nitrito	63
1.6. $\Delta nar1$ presenta un reducido crecimiento en nitrito.....	70
1.7. Nar1 está implicado en la excreción de nitrato	72
1.8. Nar1 protege de la toxicidad generada por el nitrito.....	76
1.9. Expresión de <i>HpNARI</i>	82
1.10. Regulación postraduccional de Nar1	85
1.10.1. Niveles de Nar1 en diferentes fuentes nitrogenadas.....	85

1.10.2. Nar1 está fosforilada independientemente de la calidad de la fuente nitrogenada	87
1.10.3. Comportamiento de la proteína Nar1 en diferentes fuentes de carbono	90
1.11. Nar1 se localiza fundamentalmente en la superficie celular	91
1.12. Efecto de Nar1 y Ssu2 sobre la regulación del transportador de nitrato de alta afinidad, Ynt1	93
DISCUSIÓN	97
2. Chl1 participa en la excreción de aminoácidos en <i>H. polymorpha</i>.....	107
2.1. El gen <i>HpCHL1</i> codifica una proteína con similitud a los transportadores de nitrato de baja afinidad de la familia NRT1	107
2.2. Chl1 de <i>H. polymorpha</i> pertenece a la familia NRT1 (PTR).....	111
2.3. HpChl1 no está implicada en el transporte de nitrato de baja afinidad.....	119
2.4. Caracterización de la cepa $\Delta chl1$	124
2.4.1. $\Delta chl1$ crece bien en nitrato	124
2.4.2. La mutación en <i>HpCHL1</i> reduce los valores de actividad nitrato reductasa e incrementa la excreción de nitrito.....	126
2.4.3. La delección y sobreexpresión de <i>HpCHL1</i> afectan al crecimiento en amonio	130
2.4.4. La delección en <i>HpCHL1</i> incrementa los niveles celulares de nitrógeno total.....	132
2.4.5. La cepa $\Delta chl1$ es sensible al amonio y <i>nCHL1</i> excreta aminoácidos.....	135
2.6. Estado de la vía de señalización de calcineurina en la cepa $\Delta chl1$	139
2.6.1. Viabilidad celular de $\Delta chl1$ y <i>nCHL1</i> tras la exposición al frío	139
2.7. Estado de la vía de señalización de calcineurina en la cepa $\Delta chl1$	140
DISCUSIÓN	147
IV. CONCLUSIONES	157
V. MATERIALES Y MÉTODOS	161
1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	161
1.1. Cepas bacterianas.....	161
1.2. Cepas de levaduras.....	161

1.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano	162
1.4. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de levaduras.....	163
1.4.1. Medios de cultivo y condiciones en la inducción de los genes de asimilación de nitrato de <i>H. polymorpha</i>	165
1.4.2. Preparación de las cepas en la siembra por goteo	166
2. Transformación de microorganismos	166
2.1. Transformación de bacterias	166
2.2. Transformación de <i>H. polymorpha</i>	168
3. Técnicas relacionadas con proteínas.....	170
3.1. Manipulación de extractos proteicos	170
3.1.1. Obtención de extractos celulares	170
3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares	171
3.2. Determinación de la actividad nitrato reductasa.....	171
3.3. Determinación de la actividad β -galactosidasa	172
3.3.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa <i>in situ</i> a partir de células permeabilizadas con cloroformo sobre filtros	173
3.4. Obtención de extractos de proteínas de membrana para SDS-PAGE	174
3.5. Tratamiento de los extractos proteicos con λ -proteína fosfatasa.....	175
3.6. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)	176
3.7. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	177
3.8. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas (<i>western blot</i>).....	178
4. Determinación del transporte de nitrato	179
5. Determinación del transporte de nitrito	181
6. Acumulación de nitrato y nitrito intracelular	182
7. Determinación de amonio.....	183

7.1. Consumo de amonio	183
7.2. Acumulación de amonio	184
8. Determinación de aminoácidos por HPLC	184
9. Medida del contenido de calcio intracelular mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama.....	186
9.1. Obtención de extractos totales para la determinación de calcio intracelular mediante espectroscopia de absorción atómica.....	187
10. Técnicas microscópicas	188
10.1 Tinción de las vacuolas con FM4-64	188
10.2. Observación de las células en el microscopio de epifluorescencia	188
11. Técnicas relacionadas con manipulación de ácidos nucleicos	189
11.1. Extracción de DNA plasmídico bacteriano a pequeña escala (“mini-preps”).	189
11.2. Extracción de ADN total de levadura	190
11.3. Cuantificación del ADN	192
11.4. Precipitación de ADN	192
12. Análisis y modificación de ADN.....	192
12.1. Análisis de ADN mediante electroforesis.....	192
12.1.1. Electroforesis en geles de agarosa.....	192
12.2. Modificación enzimática del ADN	193
12.2.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	193
12.2.2. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	194
12.2.3. Relleno de extremos 3’ no protuberantes	194
12.2.4. Defosforilación de extremos 5’ de moléculas de ADN.....	195
12.2.5. Adición de desoxiadenosinas a extremos 3’ romos de moléculas de ADN	196
12.2.6. Ligamiento de moléculas de ADN	197
12.3. Amplificación de moléculas de ADN por PCR.....	198

12.3.1. PCR a partir de ADN purificado	198
12.3.2. PCR en la obtención de sondas de ADN.....	200
12.3.2.1. Marcaje no radiactivo de fragmentos de ADN mediante PCR empleados como sondas	200
13. Southern blot	201
14. Principios de la técnica de PCR a Tiempo Real	204
14.1. Cuantificación de la expresión génica en la PCR a tiempo real	207
14.2. Método de análisis aplicado a la estimación relativa de la expresión génica .	207
14.3. Obtención del ADNc y reacción de RT-PCR	210
15. Metodología específica desarrollada en la realización de este trabajo.....	213
15.1. Plásmido pNAR1 y pNAR1–PfuA	213
15.2. Plásmido p $\Delta nar1$ y p $\Delta nar1::LEU2$	214
15.3. Plásmido pLEU2-NAR1-PfuA	216
15.4. Plásmido pCHL1	217
15.5. Plásmido p $\Delta chl1$	218
15.6. Plásmido pLEU2-CHL1-Pfu.1.....	219
15.7. Plásmido pYNT1LEU2A.....	220
15.8. Plásmido pNAR1-HA	221
15.9. Plásmido pNAR1-GFP	222
15.10. Plásmido pNAR1-lacZ.....	223
15.11. Plásmido pNR::LEU2 y pNJ4LEU2.....	224
VI. APÉNDICES.....	231
Apéndice I. Cepas	231
Apéndice II. Plásmidos	235
Apéndice III. Cebadores	236
Apéndice IV. Herramientas bioinformáticas	238
VII. BIBLIOGRAFÍA	243

Publicaciones 283

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

∅	diámetro
ARNasa	ribonucleasa
CC	campo claro
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiamino tetraacetato sódico
EGTA	etilenglicol tetraacetato sódico
GFP	proteína verde fluorescente
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
kDa	kilodalton
K_m	constante de Michaelis-Menten
Kpb	kilopar de bases
MES	ácido 2-[nmofolino]jetanosulfónico
min	minuto
MOPS	ácido 3-[morfolino] propanosulfónico
ms	milisegundo
NR	nitrito reductasa
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ORF	pauta abierta de lectura (<i>open reading frame</i>)
p/v	relación peso-volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RCN	represión catabólica por nitrógeno
Rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida
Tm	temperatura media de fusión
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
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

Resumen.

Esta tesis doctoral está dedicada fundamentalmente a la identificación y caracterización de transportadores de nitrato/nitrito de la levadura *Hansenula polymorpha*. El uso de las herramientas bioinformáticas nos ha permitido identificar en el genoma de *H. polymorpha* sólo dos proteínas denominadas Nar1 y Chl1 que comparten similitud de secuencia con los respectivos transportadores de nitrito y nitrato descritos en otros organismos. Los resultados del presente trabajo indican que Nar1 es una proteína ubicada en la membrana plasmática que regula la concentración intracelular de nitrito mediante su excreción. De esta forma, las células toman el nitrato del medio principalmente a través del transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad, Ynt1. Una vez en el citoplasma, el nitrato se reduce a nitrito, cuyo excedente es devuelto al medio extracelular a través de Nar1, y de otro(s) sistema(s). Pensamos que este mecanismo permite mantener el nitrito intracelular por debajo de niveles tóxicos para la levadura. Por otra parte, Chl1 participa en la excreción de aminoácidos. La acumulación intracelular de fuentes reducidas en $\Delta chl1$ promueven la represión catabólica por nitrógeno, que junto con la menor activación de la vía calcineurina, disminuyen los niveles de expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato. En conjunto, estos resultados nos han permitido conocer nuevos elementos que participan en la asimilación de nitrato, si bien ninguno de ellos parece mediar directamente el transporte de nitrato o nitrito al interior de la célula.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

1. La vía de asimilación de nitrato en los seres vivos.

El nitrógeno es un constituyente fundamental de las proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas fundamentales para la célula. Las formas asimilables de este macronutriente se encuentran en bajas cantidades en la naturaleza. Por este motivo el nitrógeno es uno de los factores que controlan la biodiversidad y dinámica de los ecosistemas.

El nitrógeno existe en la biosfera en varios estados de oxidación, de N (V) a N (-III). Las interconversiones de estas especies de nitrógeno constituyen el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, siendo las bacterias las que desempeñan el papel predominante en dichas transformaciones. El nitrógeno es asimilado por los seres vivos bajo diferentes formas químicas. Puede ser asimilado en forma de nitrógeno atmosférico mediante la fijación del N_2 ; de formas reducidas, tales como amonio y el presente en las moléculas orgánicas; y de formas oxidadas, como el nitrato y, en menor medida, el nitrito.

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno está compuesto por una etapa de fijación del N_2 ; mediado por microorganismos procariontes de vida libre, o en simbiosis con algunas leguminosas, cuyo producto es el amonio. Este compuesto también puede obtenerse a través de la amonificación, es decir, a través la descomposición de los organismos muertos, proceso mediado por ciertas bacterias y hongos. Además, el amonio es obtenido a través de la reducción del nitrato y del nitrito, constituyendo la etapa de asimilación del nitrógeno. Este es uno de los procesos biológicos fundamentales que representa más de 10^4 megatonnes de nitrógeno inorgánico transformado cada año y que supera en dos órdenes de magnitud la cantidad de nitrógeno fijado (Guerrero *et al.*, 1981). La reducción del nitrato se acopla a la oxidación anaeróbica del carbono orgánico rindiendo amonio mediante el proceso de reducción desasimilatorio de nitrato a

amonio (DRNA, *Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*). Algunas bacterias, como *Escherichia coli* y *Thiosphaera pantotropha* emplean el nitrato como aceptor de electrones durante la respiración anaerobia (Clegg *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 1993). Por otra parte, el nitrato obtenido a través de la nitrificación, es decir, por oxidación del amonio a nitrito y luego a nitrato, puede ser transformado en N_2 a través de la desnitrificación. El N_2 también se obtiene a partir del medio marino a través de la oxidación anaeróbica del amonio (anammox), donde la oxidación del amonio está acoplada a la reducción del nitrito (Canfield *et al.*, 2010). La desnitrificación y la anammox cierran el ciclo del nitrógeno al devolver el N_2 a la atmósfera (Figura 1).

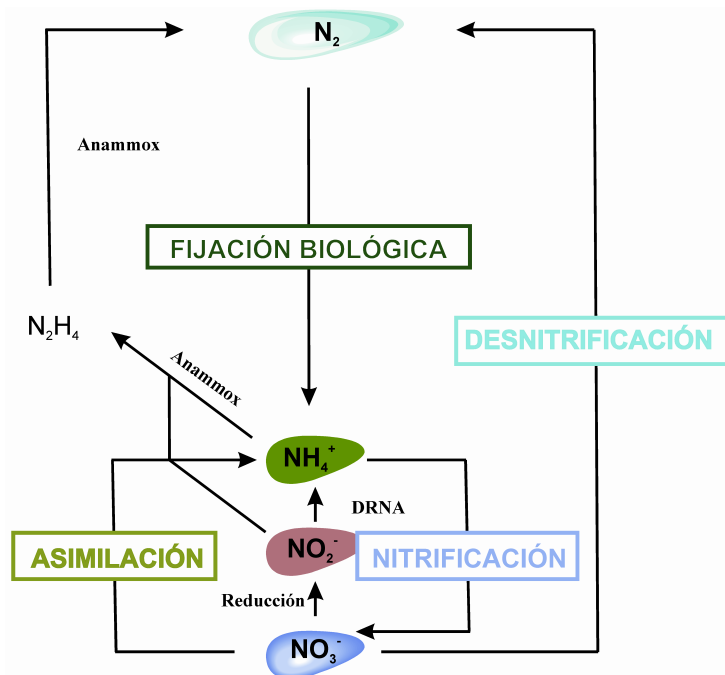


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. Se representan las principales vías biológicas de transformación del nitrógeno. (Adaptado de Canfield *et al.*, 2010).

El nitrato puede ser asimilado por algunas bacterias, ciertos hongos, algunas especies de levaduras y prácticamente todas las algas y plantas superiores. El equilibrio natural de los ecosistemas se está viendo afectado por la desregulación en el ciclo global del nitrógeno. Se estima que las actividades humanas derivadas de la fertilización incontrolada y la sustitución de áreas de vegetación natural por cultivos de leguminosas y plantas forrajeras ha provocado

que se doble la tasa natural anual de entrada de nitrógeno en el ciclo, originando serios problemas medioambientales debido a la contaminación de los acuíferos, ríos y lagos (Crawford y Glass, 1998; Daniel-Vedelle *et al.*, 1998).

Además, la contaminación de los acuíferos subterráneos con nitratos genera graves problemas de salud si se consume agua en estas condiciones, debido a la reducción del nitrato a nitrito por la participación de ciertas bacterias presentes en la boca, el estómago y la porción distal del intestino delgado y grueso. Las principales fuentes de nitrito en el organismo son: la reducción del nitrato por las bacterias de la cavidad bucal (Tannenbaum *et al.*, 1976), la ingesta de alimentos procesados con nitrito y la oxidación del NO por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Ignarro *et al.*, 1993).

Los efectos tóxicos del nitrito sobre la salud humana desarrollados a corto plazo son determinantes en la aparición de patologías como la metahemoglobinemia (Kohn *et al.*, 2002). Esta patología surge cuando el nitrito de la sangre reacciona con la oxihemoglobina produciendo nitrato y metahemoglobina. Por tanto, la ingesta excesiva de nitrito puede dar lugar a metahemoglobinemia y cianosis, especialmente en los niños pequeños cuyo sistema de metahemoglobina reductasa no está maduro (McKnight *et al.*, 1999). Por otra parte, en los glóbulos rojos, y bajo condiciones de hipoxia, el nitrito puede reaccionar con la hemoglobina desoxigenada formando NO y metahemoglobina (Doyle *et al.*, 1981).

A largo plazo el nitrito actúa como carcinógeno debido a la generación de nitrosaminas (Guttenplan, 1987; Hecht, 1997). Existe una relación directa entre la ingesta de nitrito, la formación de nitrosaminas y el riesgo de padecer cáncer gástrico (Tenovuo, 1986; Lee *et al.*, 2006). En condiciones ácidas, como las presentes en el estómago, el nitrito se protona rápidamente formando HNO_2 que se descompone dando lugar a varios óxidos de nitrógeno como N_2O_3 , NO_2 y NO. Estas especies reactivas de nitrógeno, principalmente el N_2O_3 y el NO_2 , se

oxidan fácilmente originando el ion nitrosonio (NO^+) que reacciona con las aminas dando lugar a la formación de N-nitrosaminas (Challis y Kyrtopoulos, 1977). Además, el NO^+ promueve la desaminación oxidativa de las bases nitrogenadas del ADN provocando la rotura de la hebra y el entrecruzamiento del ADN (Spencer *et al.*, 2000). Sin embargo, no todos los efectos del nitrito conllevan efectos nocivos en el ser humano. La producción gástrica de NO a partir del nitrito acidificado protege a la mucosa gástrica al incrementar el flujo sanguíneo y el espesor de la mucosidad (Björne *et al.*, 2004).

En condiciones ácidas el nitrito se reduce a óxido nítrico y éste reacciona con el radical superóxido (O_2^-) dando lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO^-). El ONOO^- oxida a los grupos tiol, genera peroxidación lipídica, provoca lesiones en el ADN y afecta a la función mitocondrial. Por todo ello se considera que el nitrito actúa como un tóxico celular.

2. Asimilación del nitrato en levaduras.

Como ya se ha comentado el nitrato es una de las fuentes de nitrógeno más abundantes en la naturaleza, pero los organismos usan más fácilmente el amonio, ya que su uso supone un menor coste energético. Las levaduras han desarrollado complejos sistemas de regulación para adaptar su maquinaria enzimática a la utilización de las fuentes de nitrógeno disponibles. Los genes que codifican las proteínas involucradas en la asimilación del nitrato son inducidos por éste y están sujetos a la represión catabólica por nitrógeno (RCN). Sin embargo, el uso del nitrato y del nitrito está restringido a pocas especies de levaduras pertenecientes a diferentes géneros (Tabla 1). Mientras que otras son capaces de usar nitrito pero no nitrato (Siverio, 2002). Las levaduras del género *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* son incapaces de usar nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno, lo que ha derivado en la escasa atención que se ha prestado a la asimilación de nitrato en las levaduras si se comparan con los

estudios desarrollados en los hongos filamentosos *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* (Wong *et al.*, 2008).

<i>Ambrosiozyma</i>	<i>Arxula</i>	<i>Bensingtonia</i>	<i>Bullera</i> ¹
<i>Candida</i>	<i>Citeromyces</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cystofilobasidium</i>
<i>Chionosphaera</i>	<i>Debaryomyces</i> ¹	<i>Dekkera</i>	<i>Fellomyces</i>
<i>Fibulobasidium</i> ¹	<i>Filobasidium</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Geotrichum</i>
<i>Hormoascus</i>	<i>Leucosporidium</i>	<i>Mrakia</i>	<i>Pachysolen</i>
<i>Oosporidium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Protomyces</i>	<i>Rhodospordium</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Saitoella</i>	<i>Sporidiobolus</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Trichosporon</i> ¹	<i>Udeniomyces</i>	<i>Wickerhamiella</i>	<i>Willopsis</i>

Tabla 1. Géneros de levaduras con especies que utilizan nitrato y nitrito. Modificado de Siverio, 2002. ¹Algunas especies de estos géneros utilizan nitrito pero no nitrato.

2. 1. Vía de asimilación del nitrato en *Hansenula polymorpha*.

El nitrato es transportado al interior de la célula mediante transportadores específicos y una vez en el citoplasma es reducido a nitrito por acción de la enzima nitrato reductasa. La nitrito reductasa reductasa el nitrito a amonio. Estos dos pasos consecutivos de reducción precisan de poder reductor, que viene dado por nucleótidos de piridina reducidos.

En *H. polymorpha* los genes que codifican el transportador de nitrato (*YNT1*), la nitrato reductasa (*YNRI*) y la nitrito reductasa (*YNII*) se encuentran en un *cluster* en el genoma de la levadura (Pérez *et al.*, 1997; Ávila *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1996) junto con otros dos genes que codifican los factores transcripcionales de tipo Zn(II)₂Cys₆, *YNA1* e *YNA2* (Ávila *et al.*, 1998; Ávila *et al.*, 2002) (Figura 2). Sin embargo, no se sabe cómo la levadura percibe el nitrato y trasmite esta señal al interior celular para su utilización. Diversos estudios han demostrado que *S. cerevisiae* siente algunos nutrientes del medio a través de tres tipos de sensores presentes en la membrana plasmática (Rubio-Teixeira *et al.*, 2010). El primer tipo de sensores está formado por los receptores clásicos o los

receptores acoplados a proteína G, que en levaduras detectan la presencia de glucosa y sacarosa o feromonas. La proteína Gpr1 es un sensor de glucosa implicado en la síntesis de AMPc (Kraakman *et al.*, 1999) necesario en la regulación de la expresión génica de *SUC2* que codifica la invertasa (Belinchón y Gancedo, 2007). El segundo tipo de sensores está formado por los transeptores que no transportan nutrientes, es decir, son homólogos a los transportadores pero su función es la de sensor y han perdido la capacidad de transportar cualquier sustrato. En este tipo de sensores se encuentran Snf3 y Rgt2, responsables de la inducción de genes que codifican transportadores de glucosa y hexosas (Özcan *et al.*, 1998), y el sensor Ssy1, necesario en la desrepresión de los genes inducidos por aminoácidos que codifican las permeasas específicas de aminoácidos (Didion *et al.*, 1998). La unión de la glucosa a la proteína Snf3 o a Rgt2 desencadena una serie de reacciones que resulta en la remoción del represor Rgt1 de los promotores de los genes diana, entre los que se encuentran varios genes *HXT* implicados en el transporte de glucosa (Moriya y Johnston, 2004). Los transportadores de alta afinidad de glucosa, como Hxt4 y Hxt7, se expresan cuando la concentración de glucosa en el medio es baja, y su expresión depende del sensor Snf3 (Özcan *et al.*, 1996; Lalonde *et al.*, 1999). El sensor Rgt2 es necesario en la inducción de la expresión génica en respuesta a altos niveles de glucosa. Estos sensores de glucosa difieren en la región carboxilo terminal con los transportadores de glucosa (Özcan *et al.*, 1998; Van Belle y André, 2001). Los sensores ambientales de glucosa actúan en paralelo con los sistemas de detección de metabolitos intracelulares, por lo que las levaduras integran las señales nutricionales a partir de los diferentes sistemas de detección regulando la expresión génica (Forsberg y Ljungdahl, 2001). La proteína Ssy1 de *S. cerevisiae* es necesaria en la inducción de la expresión de genes que codifican permeasas de aminoácidos y del gen *PTR2*, el transportador de di y tripéptidos (Didion *et al.*, 1998; Forsberg *et al.*, 2001; Forsberg y Ljungdahl, 2001). Es la región amino terminal de Ssy1 la responsable de transmitir las señales inducidas por los aminoácidos presentes en el medio (Klasson *et al.*, 1999; Fosberg *et al.*, 2001). El tercer tipo de sensores son los transeptores transportadores, es decir, son

transportadores de nutrientes que combinan esta función con la de receptor. Dentro de este grupo se encuentran Gap1, la permeasa general de aminoácidos (Donaton *et al.*, 2003); Mep2, el transportador de amonio de alta afinidad implicado en inducir el crecimiento filamentoso de las células en ausencia de este compuesto (Lorenz y Heitman, 1998; Van Nuland *et al.*, 2006); y Pho84, el transportador de fosfato (Giots *et al.*, 2003).

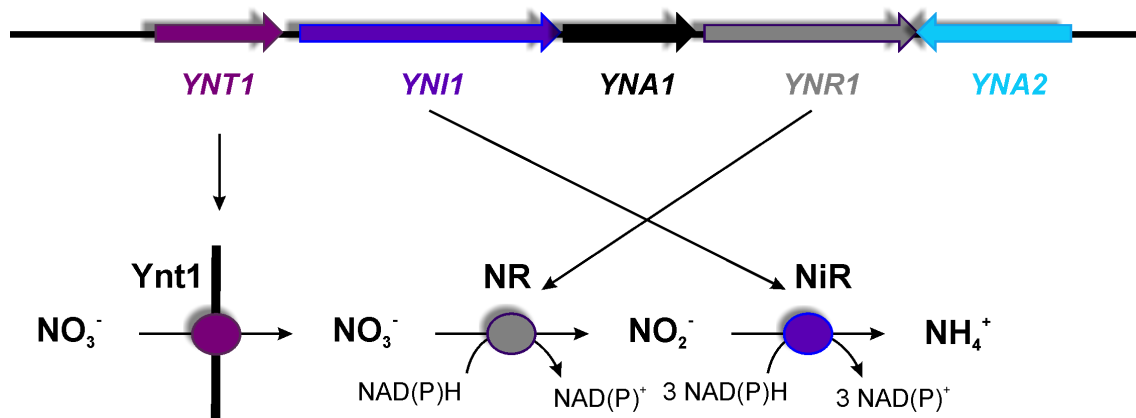


Figura 2. Esquema del *cluster* de los genes implicados en la vía de asimilación de nitrato en *H. polymorpha* y de las proteínas codificadas.

En muchos organismos asimiladores de nitrato, los genes que codifican la maquinaria necesaria para metabolizar el nitrato se encuentran agrupados en el genoma, quizás como estrategia que permite una expresión coordinada y una regulación más eficiente. En la arqueobacteria *Haloferax mediterranii* los genes implicados en la asimilación del nitrato están en dos operones génicos consecutivos formados por los genes *nasABC* y *nasD*. El gen *nasA* codifica la nitrato reductasa, *nasB* codifica una proteína de membrana con similitud al transportador NarK, *nasC* codifica una enzima con similitud a MobA, implicada en la unión de GTP a la molibdopterina, y *nasD* codifica una nitrito reductasa dependiente de ferredoxina (Lledó *et al.*, 2005). En los eucariotas, como *Aspergillus nidulans* los genes que codifican un transportador de nitrato (*nrtA*), la nitrato reductasa (*niaD*) y la nitrito reductasa (*niiA*) se encuentran agrupados en el genoma (Johnstone *et al.*, 1990). En *Chlamydomonas reinhardtii* estos genes forman dos agrupamientos génicos diferentes (Quesada *et al.*, 1998). En uno de los *cluster* se encuentran los genes implicados en el transporte de nitrato (*Nrt2;2*)

y de nitrato/nitrito (*Nrt2;1*), el gen *Nar2*, que codifica la proteína estructural necesaria en la actividad funcional de NRT2;1 y NRT2;2 (Quesada *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2000), los genes que codifican la nitrato y nitrito reductasa (*Nia1* y *Nii1*, respectivamente) y el gen *Nar1* que codifica un transportador de nitrito del cloroplasto necesario en el crecimiento en presencia de nitrato bajo condiciones limitantes del mismo, así como en el uso eficiente de nitrato en condiciones limitantes de carbono (Rexach *et al.*, 2000; Mariscal *et al.*, 2004). El otro cluster agrupa a dos genes, uno de ellos codifica un transportador biespecífico de nitrato/nitrito (*Nrt2;3*) (Quesada *et al.*, 1998) y un gen de función desconocida (*Nar5*).

El amonio generado en la reducción del nitrato es usado en la síntesis de dos aminoácidos: el glutamato y la glutamina (Sttit, 1999; TerSchure *et al.*, 2000) (Figura 3).

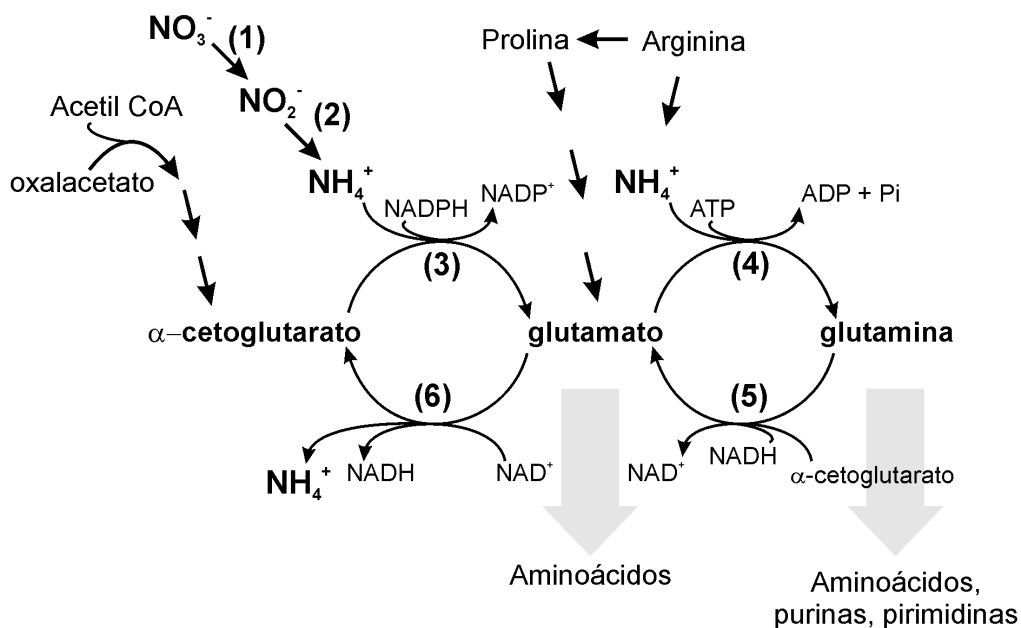


Figura 3. Vía de asimilación de nitrato. El NO_3^- entra en la célula a través de los transportadores y se reduce a NO_2^- por acción de la nitrato reductasa (1). Éste se reduce a NH_4^+ por la nitrito reductasa (2). El NH_4^+ es incorporado al α -cetoglutarato procedente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H (3) y al glutamato por la glutamina sintetasa (4). El glutamato se puede obtener desde la glutamina y el α -cetoglutarato por acción de la glutamato sintetasa (5). El glutamato es desaminado por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (6). A partir del glutamato y de la glutamina se obtienen los restantes aminoácidos así como las purinas y pirimidinas. Modificado de Magasanik y Kaiser, 2002.

El poder reductor, en forma de NAD(P)H, y los precursores de la glutamina y el glutamato provienen del metabolismo del carbono. El primero proviene de la vía de las pentosas fosfato; y el ácido α -cetoglutarato es el precursor que deriva del ciclo de los ácidos tricarboxílicos donde actúa como intermediario. El nitrógeno amino del glutamato constituye el 85% de la fuente de nitrógeno total celular y el grupo amida de la glutamina, el 15% de la fuente remanente.

2. 2. Regulación de la vía de asimilación de nitrato.

Las levaduras son capaces de responder y adaptarse rápidamente a los cambios del ambiente, lo que resulta esencial para su supervivencia. Uno de los requisitos para generar una respuesta fisiológica adecuada es la capacidad de sentir y en consecuencia, transducir la información de los niveles de metabolitos presentes en el medio extra e intracelular. Por ejemplo, en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, las levaduras regulan la expresión y la actividad de las proteínas implicadas tanto en la asimilación como en la utilización de estos nutrientes.

La vía de asimilación de nitrato, y por tanto, la utilización de este compuesto dependen de la presencia de fuentes de nitrógeno reducidas en el medio de cultivo. Las diferentes fuentes de nitrógeno se pueden clasificar en base al efecto que producen sobre el metabolismo del nitrógeno, diferenciando entre fuentes preferidas (o ricas) y no preferidas (pobres o alternativas). Las fuentes preferidas, como la glutamina, la asparagina y el amonio, desencadenan la regulación negativa del catabolismo de otros compuestos de nitrógeno mientras que las fuentes no preferidas o alternativas, como el nitrato, la prolina, la urea o la alantoína, no tienen efecto sobre el catabolismo de otros compuestos de nitrógeno (Magasanik y Kaiser, 2002). Cuando las células disponen de fuentes de nitrógeno preferidas todas las vías implicadas en la asimilación de fuentes de

nitrógeno alternativas, como la vía de asimilación de nitrato, están sujetas a un proceso de regulación negativa.

2. 2. 1. Regulación transcripcional: factores GATA, Ure2 y vía de las quinasas TOR.

La inducción de los genes de la vía de asimilación de nitrato tiene lugar cuando se conjugan dos señales: una de ellas es la señal de desrepresión que afecta a todos los genes relacionados con el metabolismo de fuentes de nitrógeno alternativas y, la otra es la señal de inducción que tiene lugar cuando el nitrato entra en la célula (Marzluf, 1997; Siverio, 2002; Cooper, 2002).

La señal de desrepresión está mediada por el mecanismo de Represión Catabólica por Nitrógeno (RCN), que evita la transcripción de los genes implicados en la asimilación y uso de fuentes no preferidas, como el nitrato, cuando en el medio existen fuentes preferidas. Este proceso, presente en hongos y levaduras, está mediado por los factores transcripcionales tipo GATA y por proteínas que interaccionan con estos factores modulando su actividad (Marzluf, 1997; Magasanik y Kaiser, 2002; Siverio, 2002; Wong *et al.*, 2008).

Los factores GATA reciben este nombre porque se unen a la secuencia de ADN (A/T)GATA(A/G) (Merika y Orkin, 1993). En *N. crassa* y *Aspergillus nidulans* el proceso de represión y desrepresión de los genes implicados en la asimilación del nitrato está mediado por los factores transcripcionales NIT2 y AREA, respectivamente (Marzluf, 1981). Estos factores son reguladores positivos que median la señal de desrepresión, es decir, activan la expresión de los genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas (Kudla *et al.*, 1990; Chiang y Marzluf, 1995; Todd *et al.*, 2005). La expresión y función de estos factores se encuentra controlada a varios niveles ya que también están sometidos a RCN y en el caso de areA, su promotor presenta sitios GATA que lo regulan de forma autógena (Langdon *et al.*, 1995). Por otra parte, la estabilidad del ARNm de areA está modulada por los niveles intracelulares de glutamina a

través de la región 3' del mensajero, conocida como 3' UTR (3' *untranslated region*), de tal forma que en presencia de glutamina (o asparagina) se produce la degradación de los transcritos de *areA* (Morozov *et al.*, 2001).

La presencia de una fuente de nitrógeno preferida en el medio conlleva a la señal de represión mediada por los represores transcripcionales NmrA de *A. nidulans* y Nmr1 de *N. crassa*. (Xiao *et al.*, 1995; Andrianopoulos *et al.*, 1998).

La levadura *S. cerevisiae* no asimila nitrato aunque sí crece a partir de otras fuentes no preferidas cuya asimilación está sujeta a RCN. Esta respuesta está mediada por factores transcripcionales positivos y negativos que compiten entre sí por su unión a las secuencias GATA de los promotores de los genes que controlan (Coffman *et al.*, 1997; Magasanik y Kaiser, 2002). Los activadores transcripcionales son Gln3 y Gat1 y los represores transcripcionales son Dal80/Uga43 y Deh1/Gzf3/Nil2 estando todos ellos interconectados en un circuito regulador. La desrepresión de los genes sometidos a RCN depende de la interacción entre el modulador negativo Ure2 y los activadores Gln3 y Gat1. En condiciones de disponibilidad de nitrógeno Ure2 retiene a Gln3, y posiblemente a Gat1, en el citoplasma impidiendo la activación de los genes implicados en la asimilación de fuentes pobres (Cunningham *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2000). Cuando hay escasez de nitrógeno o se trata a las células con rapamicina, Ure2 libera a los factores positivos permitiendo la expresión de los genes sujetos a RCN. El grado de expresión de estos genes está a su vez modulada por los factores transcripcionales negativos. Con la excepción de Gln3, todos los genes GATA se regulan entre sí y a sí mismos.

La rapamicina es un macrólido lipofílico con actividad antifúngica, inmunosupresora y anti-cancerígena. Se une a una peptidil-propil isomerasa de 12 kDa, denominada FKBP12, y este complejo inhibe a las quinasas TOR de *S. cerevisiae* (Lorenz y Heitman, 1995; Crespo y Hall, 2002). En esta levadura hay dos quinasas TOR, TOR1 y TOR2 que forman dos complejos diferentes en

estructura y función. Es el complejo TORC1, formado por TOR1 o por TOR2, el que se inhibe por rapamicina (Loewith *et al.*, 2002). TORC1 controla el crecimiento celular regulando los procesos de transcripción, traducción, asimilación de nutrientes, biogénesis de ribosomas y la autofagia (Wullschleger *et al.*, 2006). Las quinasas TOR participan en la RCN de los genes que codifican proteínas implicadas en la asimilación de fuentes de nitrógeno pobres. Así, el tratamiento con rapamicina genera la inhibición de la vía TOR mimetizando las condiciones de ayuno de nitrógeno, por tanto, se produce la desrepresión de los genes sujetos a RCN (Thomas y Hall, 1997). La vía TOR impide la expresión de estos genes, controlando la ubicación celular del factor Gln3. En presencia de fuentes de nitrógeno preferidas TORC1 forma un complejo con Tap42 (*Tor associated protein*) y la fosfatasa Sit4 que permanece inactiva (Di Como y Arndt, 1996; Jiang y Broach, 1999). En estas condiciones Gln3 (en estado fosforilado) permanece unido a Ure2 en el citoplasma, por lo que hay represión de los genes sujetos a RCN. Si el nitrógeno escasea o las células son tratadas con rapamicina, el complejo Tap42-Sit4 se disocia de TORC1 y se activa. En estas condiciones Gln3 es desfosforilado y entra en el núcleo ejerciendo la desrepresión de los genes diana (Beck y Hall, 1999). Este modelo de regulación se encuentra en continua revisión tanto por la obtención de nuevas evidencias así como por la identificación de nuevos componentes, por lo que la regulación transcripcional mediada por las quinasas TOR es bastante más compleja. Contrariamente a lo observado en *S. cerevisiae*, el tratamiento de *A. nidulans* con rapamicina no produce una mayor inducción en la expresión de la permeasa general de aminoácidos, la glutamina sintasa y la permeasa de amonio (Fitzgibbon *et al.*, 2005).

2. 2. 2. Regulación transcripcional: La vía calcineurina.

La calcineurina es una Ser/Thr fosfatasa regulada por Ca^{2+} /calmodulina (Mendoza *et al.*, 1994). Esta fosfatasa es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. En *S. cerevisiae* la subunidad

catalítica está codificada por dos genes redundantes, *CNA1* y *CNA2*, mientras que la subunidad reguladora está codificada por un único gen, *CNBI* (Cyert *et al.*, 1991; Kuno *et al.*, 1991; Cyert y Thorner, 1992; Cyert, 2003).

La calcineurina es inhibida específicamente por los inmunosupresores FK506 y ciclosporina A (Nakamura *et al.*, 1993). Las células carentes en los genes *CNBI*, *CNA1* y *CNA2* o las células silvestres tratadas con FK506, son sensibles al ser expuestas a diversas situaciones ambientales como la alcalinización del medio (Ariño, 2011), la exposición a iones (Mn^{2+} y Na^+/Li^+) o la incubación prolongada con la feromona del apareamiento (factor α) (Cyert y Thorner, 1992; Nakamura *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Farcasanu *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1996; Withee *et al.*, 1997). Además la calcineurina es esencial en mutantes con defectos de pared celular, como *fks1* (Eng *et al.*, 1994; Garret-Engle *et al.*, 1995). Por tanto, la vía de señalización de la calcineurina se activa en respuesta a estrés ambiental.

En condiciones de crecimiento normales el nivel de calcio citosólico es bajo y la calcineurina permanece inactiva. En cambio, en respuesta a estrés, los niveles de calcio citosólico aumentan provocando la activación de la calcineurina, lo que desencadena una serie de respuestas que permiten a la célula sobrevivir frente a la condición de estrés (Figura 4).

El calcio externo entra a la célula a través de un complejo formado por los canales Cch1 y Mid1 (Iida *et al.*, 1994; Paidhungat y Garret, 1997). Estos canales están implicados en la entrada de calcio que tiene lugar en respuesta a feromonas, estrés del retículo endoplasmático por el incremento de proteínas no plegadas, estrés salino y pH alcalino (Bonilla *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2002; Viladevall *et al.*, 2004). Este flujo de calcio es retroinhibido por la activación de la calcineurina (Matheos *et al.*, 1997; Locke *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2001) al desfosforilar directamente a Cch1 *in vitro*, y probablemente *in vivo* (Bonilla y Cunningham, 2003).

Además de impedir la entrada, los niveles de calcio citosólico son restablecidos por la acción de bombas de calcio del retículo endoplasmático y de la vacuola. *Pmr1* es una ATPasa de calcio (y de Mn^{2+}) de alta afinidad del retículo endoplasmático. La detoxificación de calcio mediante el secuestro de este catión en la vacuola se lleva a cabo por la acción de dos transportadores, *Pmc1*, que es una ATPasa de Ca^{2+} , y *Vcx1*, que es un intercambiador de Ca^{2+}/H^+ . La calcineurina activa la transcripción de *PMR1* y *PMCI* (Stathopoulos y Cyert, 1997; Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999) e inhibe la actividad de *Vcx1* a nivel postranscripcional (Cunningham y Fick, 1996).

La calcineurina controla la expresión de una gran variedad de genes a través de la activación del factor transcripcional *Crz1* (Stathopoulos y Cyert, 1997; Matheos *et al.*, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998). *Crz1* se une específicamente al elemento de respuesta dependiente de calcineurina (CDRE), presente en el promotor de los genes regulados por la calcineurina. La activación de la calcineurina conlleva a la desfosforilación de *Crz1*, afectando a su localización celular ya que se traslada desde el citosol al núcleo donde activa la transcripción génica (Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999). La fosforilación de *Crz1* depende de la quinasa activada por AMPc, PKA, por lo esta enzima regula negativamente la vía de señalización de la calcineurina (Kafadar y Cyert, 2004).

El mutante *cnb1* de *S. cerevisiae* acumula cantidades elevadas de Li^+/Na^+ (Nakamura *et al.*, 1993), como resultado de la menor expresión del gen *ENAI* y una menor actividad del sistema de transporte *Trk1-Trk2* (Mendoza *et al.*, 1994). El gen *ENAI* codifica una Na^+ -ATPasa de tipo P de la membrana plasmática implicada en la salida de sodio y litio de la célula (Mendoza *et al.*, 1994). La calcineurina regula la transcripción de *ENAI* a través del factor transcripcional *Crz1*. En el promotor de *ENAI* se han identificado dos elementos CDRE en las posiciones -813/-821 y -727/-719, aunque el que se localiza en la posición -727/-719 es el más relevante para la respuesta transcripcional bajo condiciones de

estrés (Mendizabal *et al.*, 2001). Por otra parte, la expresión de *ENAI* se encuentra regulada por la vía TOR, ya que en su promotor también hay secuencias reconocidas por los factores GATA, Gln3 y Gat1, estando la mayoría de ellas dispersas entre las posiciones -950 a -1400 (Crespo *et al.*, 2001). Además, la inducción de la expresión de *ENAI* en respuesta a pH alcalino también está regulada por la activación de la vía de señalización de la calcineurina. Aproximadamente el 40% de la respuesta transcripcional total a pH alcalino parece estar mediada por la activación de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2002). El estrés por pH alcalino provoca un incremento en la concentración de calcio citosólico, activando a la calcineurina y en consecuencia a Crz1 (Viladevall *et al.*, 2004) que entra en el núcleo induciendo la expresión de un conjunto de genes en respuesta a la alcalinización del medio. Otro gen cuya inducción es dependiente de calcineurina y de la presencia de pH alcalino es *PHO89* (Serrano *et al.*, 2002). La expresión de este gen, que codifica un cotransportador de Pi/Na^+ , aumenta en respuesta al calcio, al ayuno de fosfato y al estrés salino (Persson *et al.*, 1999) y es dependiente de la activación de la calcineurina, presentando un elemento CDRE en la posición -515/-504 del promotor (Yoshimoto *et al.*, 2002). La vía de la calcineurina, a través de la activación de Crz1, induce la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa por estrés alcalino como *HXT2* que codifica un transportador de glucosa de alta afinidad y cuya expresión sucede en condiciones ayuno de glucosa (Ruiz *et al.*, 2008). La activación de la calcineurina también induce la expresión génica de *GSC2/FKS2*, que codifica una subunidad catalítica de la 1,3- β -glucano sintasa, esencial en el proceso de esporulación y en la formación de glucano durante el apareamiento (Mazur *et al.*, 1995).

Se ha estudiado como la tolerancia a sales está relacionada con el incremento en la tasa de supervivencia de las células expuestas a procesos de congelación. Vista la implicación de la calcineurina-Crz1 en la regulación de la expresión de genes que confieren resistencia a sales, se ha propuesto que esta vía también podría regular la expresión de dichos genes cuando las células se

exponen a procesos de congelación, dado el desequilibrio iónico causado por la formación de cristales de hielo (Wolfe y Bryant, 1999). Así, el incremento en la expresión de los genes dianas controlados por calcineurina-Crz1 permitiría a las células de levaduras mitigar los efectos nocivos del estrés salino durante la congelación. De hecho, la sobreexpresión de *CRZ1* en *S. cerevisiae* aporta mayor tolerancia a la congelación, incrementando la viabilidad celular una 10 veces, aunque no se han observado fenotipos asociados a la congelación en ausencia de Cnb1 o de Crz1 (Panadero *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito un incremento en la supervivencia de las células de la cepa silvestre y de las afectadas en *CNB1* o *CRZ1* sometidas a congelación al ser tratadas previamente con NaCl. Este hecho descarta la implicación de la vía de señalización de la calcineurina en la activación de los mecanismos de protección frente a la congelación. Por tanto, la tolerancia a la congelación obtenida al sobreexpresar *CRZ1* parece ser debida a un papel inespecífico que adquiere este factor transcripcional cuando su expresión está alterada, lo que podría afectar las características generales modificando la expresión de cientos de genes e influyendo positivamente en la resistencia al estrés (Attfield, 1997; Rández *et al.*, 1999). Por tanto, en *S. cerevisiae* la congelación no activa una respuesta de protección ni a través de calcineurina-Crz1 ni directamente a través de Crz1.

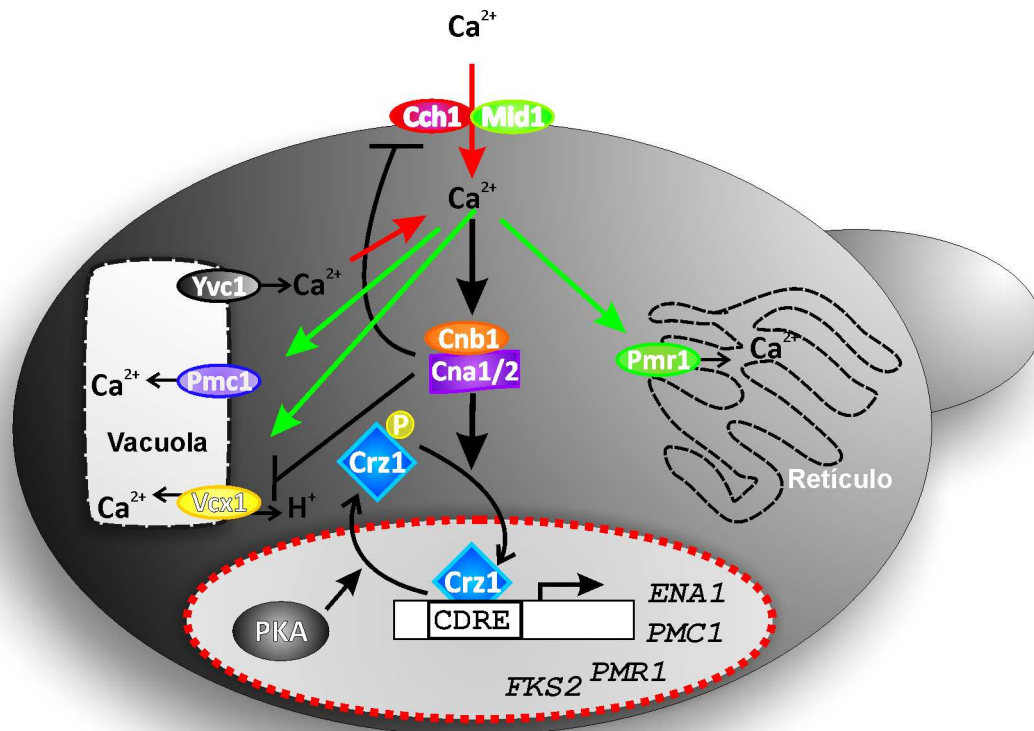


Figura 4. Vía de señalización de la calcineurina en *S. cerevisiae*. Se muestran los principales transportadores responsables de la regulación de la homeostasis del calcio: Cch1-Mid1 (en la membrana plasmática), Pmr1 (en la membrana del retículo endoplasmático) y Yvc1, Vcx1 y Pmc1 (en la membrana de la vacuola). También se representan algunos sustratos directos de la calcineurina: los transportadores Cch1 y Vcx1 y el factor transcripcional Crz1. Las flechas de color rojo indican los transportadores que están implicados en el incremento de la concentración de calcio citosólico. En verde se simbolizan los transportadores que secuestran el calcio del citosol.

Estudios recientes desarrollados en nuestro grupo muestran que en *H. polymorpha* la inducción de la expresión de los genes implicados en la tolerancia a sales, como *ENAI*, y de los genes sujetos a RCN, como los genes de la vía de asimilación de nitrato, está bajo el control de la vía de señalización de la calcineurina. Así, en presencia de sales o de nitrato se produce un incremento en el contenido de Ca^{2+} intracelular procedente del medio. Esta entrada de calcio está sujeta a un proceso de retroinhibición promovido por la acumulación del calcio en el retículo endoplasmático, proceso mediado por la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana reticular Pmr1. La activación de la calcineurina, tras el aumento en la concentración de calcio citosólico, promueve la desfosforilación del factor de transcripción Crz1 que entra en el núcleo induciendo la expresión de *ENAI*. Además, la expresión de *HpENAI* también depende del factor transcripcional

Gat1, cuya expresión está bajo el control de la vía de señalización calcineurina, mediada por Crz1. Por tanto, la expresión de *ENA1* está bajo el control dual de la calcineurina vía Crz1 y de la calcineurina-Crz1 vía Gat1 (Figura 5) (Rodríguez *et al.*, 2010).

Al igual que *ENA1*, los genes de la vía de asimilación de nitrato también se encuentran regulados por la calcineurina. El incremento del calcio intracelular que tiene lugar en ausencia de nitrógeno lo que activa la vía calcineurina incrementando los niveles de expresión de Gat1, necesario en la desrepresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato (Rodríguez *et al.*, 2010). Por otra parte, Gat1 controla la expresión de otro factor GATA positivo, Gat2, que regula la expresión tanto de *PMR1* (Rodríguez *et al.*, 2010) como del factor transcripcional *YNA2* (Rodríguez, tesis doctoral, 2011), necesario en la inducción de la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato. En presencia de fuentes preferidas Gat2, al igual que los factores Gat1 y Gln3, permanecería en el citosol unido al modulador negativo Ure2. Sin embargo, en presencia de fuentes de nitrógeno alternativas, como el nitrato, se produce la disociación de los complejos Ure2-GATA. En estas condiciones, Gat2 entra en el núcleo y activa la expresión de *PMR1*, lo que se traduce en incremento del Ca^{2+} reticular y con ello la inhibición de la entrada del calcio desde el medio. Por tanto, en estas condiciones existe baja activación de la vía de señalización calcineurina. Por otra parte, Gat2 también activa la expresión del factor transcripcional *YNA2*, indispensable en la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato. Una vez que el nitrato entra en la célula se inicia la obtención de amonio, siendo el balance entre la señal de inducción (nitrato intracelular), y la señal de represión (amonio sintetizado) la que determina la formación de los complejos citosólicos Ure2-GATA y en consecuencia el grado de expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato (Rodríguez, tesis doctoral, 2011).

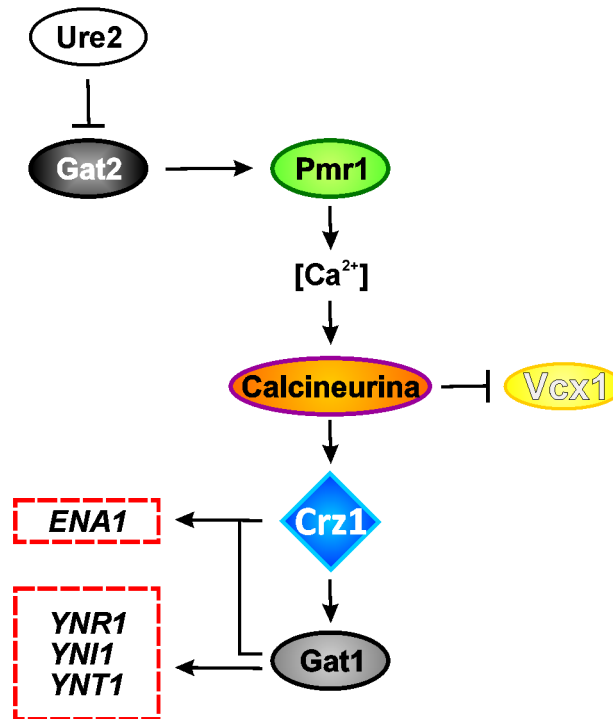


Figura 5. Vía de señalización de la calcineurina en *H. polymorpha*. Ure2 regula el contenido de Ca^{2+} celular a través de Gat2 el cual regula la transcripción de *PMR1*. Pmr1 regula los niveles de Ca^{2+} citosólicos al secuestrar el calcio en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, modulando de esta forma la activación de la calcineurina. La activación de la calcineurina induce la expresión de *ENA1* y de los genes de la vía de asimilación de nitrato a través de Crz1-Gat1. *ENA1* también se induce directamente a través de Crz1. La transcripción de Gat2 se activa a través de Gat1. El modelo asume que Ure2 retiene a los factores GATA en el citosol en presencia de fuentes de nitrógeno preferidas. Extraído de Rodríguez *et al.*, 2010.

3. Los transportadores de nitrato y nitrito.

Los organismos procariotas y eucariotas que asimilan nitrato y nitrito presentan varios sistemas de transporte con características estructurales similares pero totalmente diferentes desde el punto de vista cinético (Omata, 1995; Galván *et al.*, 1996; Wu y Stewart, 1998; Machín *et al.*, 2001; Jia y Cole, 2005; Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). Algunos autores han sugerido que varios transportadores derivan de otro por duplicación génica y han seguido de un proceso de diferenciación cinética proporcionando plasticidad ecológica al transporte de nitrato, ya que su concentración en la naturaleza puede cambiar varios órdenes de magnitud (Unkles *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008).

Los sistemas de transporte de nitrato de eucariotas se han clasificado atendiendo a los datos fisiológicos, es decir, en función de la afinidad e inducción por el nitrato, y según las características de las secuencias de los genes que codifican dichos transportadores. Atendiendo a la afinidad y a la capacidad del nitrato para inducir su expresión se diferencian cuatro tipos: sistemas de transporte de nitrato de alta afinidad constitutivos (cHANTS) e inducibles (iHANTS), y sistemas de transporte de nitrato de baja afinidad constitutivos (cLANTS) e inducibles (iLANTS) (Aslam *et al.*, 1992; Galván y Fernández, 2001). Desde un punto de vista cinético podemos diferenciar dos grupos de transportadores de nitrato: i) los transportadores de alta afinidad, cuya K_m está en el orden micromolar, presente en levaduras, hongos filamentosos, algas y plantas, y ii) los transportadores de baja afinidad, cuya K_m está en el orden milimolar, presente en plantas y algas, y posiblemente también levaduras.

- 1) **cHANTS** (*constitutive high affinity nitrate transport systems*). Están presentes en la cebada, *Hordeum vulgare* (Aslam *et al.*, 1992), y en *Arabidopsis* (Wang y Crawford, 1996), aunque aún no se han identificado los genes que codifican dichos transportadores. Tienen K_m muy baja (5-20 μM) y también baja velocidad máxima, por lo que se les considera de baja capacidad de transporte.
- 2) **iHANTS** (*inducible high affinity nitrate transport systems*). La K_m es moderadamente baja en plantas (20-200 μM), aunque se ha estimado que puede bajar hasta 2 μM en ciertos eucariotas inferiores (Forde, 2000). Llevan a cabo casi todo el transporte de nitrato cuando su concentración en el medio está en el rango micromolar. Son inducibles por nitrato o nitrito y están sometidos a represión por amonio y otras fuentes de nitrógeno reducidas. Dentro de este grupo se encuentran los transportadores de nitrato codificados por los genes *crnA* de *A. nidulans* (Unkles *et al.*, 1991), *BCH* de *H. vulgare* (Vidmar *et al.*, 1999) y *nit-10* de *N. crassa* (Gao-Rubinelli y Marzluf, 2004).

- 3) **cLANTS** (*constitutive low affinity nitrate transport systems*). Sólo contribuyen al consumo de nitrato de forma significativa cuando su concentración está en el rango milimolar. No parecen estar afectados por la fuente de nitrógeno. En este grupo se encuentra el transportador de nitrato codificado por *NRT1.2 (NTL1)* de *A. thaliana* (Huang *et al.*, 1999), el putativo transportador de nitrato *NRT1;1* de tomate, *Lycopersicon esculentum* (Lauter *et al.*, 1996) y *OsNRT1* de arroz, *Oryza sativa* (Lin *et al.*, 2000).

- 4) **iLANTS** (*inducible low affinity nitrate transport systems*). En *Arabidopsis thaliana* es el gen *CHL1 (NRT1.1)* el que codifica este transportador inicialmente caracterizado como un transportador de baja afinidad (Tsay *et al.*, 1993) aunque posteriormente se caracterizó como un transportador de baja y alta afinidad de nitrato (Liu *et al.*, 1999). Otros transportadores de nitrato de este grupo están codificados por *Nrt2;3* de *C. reinhardtii* (Navarro *et al.*, 2000), previamente descrito como un iHANT, asociado al transporte de nitrito (Rexach *et al.*, 1999), y *NRT1.2* de *Brassica napus* (Zhou *et al.*, 1998).

Atendiendo a la similitud de secuencias de los genes que codifican los transportadores de nitrato se diferencian dos familias génicas: NTR1 y NTR2 (Crawford y Glass, 1998; Forde, 2000). Los transportadores NRT1 pertenecen a la familia proteica PTR (*Peptide Transport*) (Steiner *et al.*, 1995), que incluye a transportadores de oligopéptidos dependientes de H⁺ presentes en mamíferos, plantas, hongos y bacterias (Pao *et al.*, 1998; Paulsen y Skurray, 1994). Aunque la familia génica *NRT1* tiene una secuencia similar a varios miembros de la superfamilia mayor de facilitadores (MFS), contienen segmentos pequeños similares entre ellos que la diferencia de la familia génica *NRT2* (Pao *et al.*, 1998). Las proteínas NRT2 tienen 12 dominios transmembrana, con un largo *loop* hidrofílico situado entre el sexto y el séptimo dominio, y con extremos N- y

C-terminales cortos como en CrnA de *A. nidulans* e Ynt1 de *H. polymorpha* (Unkles *et al.*, 1991; Tsay *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999). Sin embargo algunos miembros de esta familia presentan un extremo C-terminal largo e hidrofílico como ocurre con los transportadores codificados por *CrNRT2;1 (nar3)*, *CrNRT2;2 (nar4)* y *HvNrt2;1 (BCH1)* (Quesada *et al.*, 1994; Trueman *et al.*, 1996). Las proteínas de la familia NTR2, pertenecientes a la MFS, presentan la capacidad de transportar nitrato y/o nitrito. Debido a esta última característica, también se conoce a esta familia como NNP (*Nitrate Nitrite Porters*). Las proteínas NRT2 comparten el motivo consenso [FYK]-X₃-[ILQRK]-X-[GA]-X-[VASK]-X-[GASN]-[LIVFQ]-X_{1,2}-G-X-G-[NIM]-X-G-[GVTA], situado en el quinto dominio transmembrana, que constituye la secuencia firma de la familia NNP (Pao *et al.*, 1998). Parte de esta secuencia está presente en las proteínas *crnA* de *A. nidulans*, NRT2 de *Chlamydomonas* y de *H. vulgare*, y NarK de *E. coli*, lo que ha sugerido que este motivo podría estar implicado en el reconocimiento del sustrato (Trueman *et al.*, 1996).

3.1. Familia NRT1 (PTR).

La capacidad de importar péptidos es una función celular que se da en bacterias, hongos, plantas y animales (Steiner *et al.*, 1995; Payne y Smith, 1994). Varios de estos organismos poseen parálogos de la familia POT o PTR. Esta familia proteica fue descrita por dos laboratorios diferentes. En 1994, Paulsen y Skurray describieron la secuencia parcial varios miembros de una nueva familia de transportadores que llamaron familia POT (familia de transportadores de oligopéptidos dependientes de protones -o de fuerza protón motriz-). Posteriormente, Steiner *et al.*, (1995) la denominaron como familia PTR (familia de transportadores de péptidos). Ninguno de estos grupos observaron similitud de secuencias entre estos transportadores y las permeasas de la MFS. Sin embargo, la familia PTR presenta similitud de secuencia con dos de las 17 familias que constituyen la MFS. Una de ellas es la familia SP (*Sugar Porter*), implicada en el transporte de galactosa, lactosa, maltosa y α -glucósidos en levaduras y hongos, y

la otra es la familia DHA14 (*Drug:H⁺ Antiporter 14-spanner Drug Efflux Family*), implicada en la excreción de drogas (Pao *et al.*, 1998). Las proteínas de esta familia tienen de 450 a 600 residuos aminoacídicos, siendo las proteínas eucarióticas las de mayor tamaño. Aunque el valor nutricional que tienen los péptidos como fuente de aminoácidos, carbono y nitrógeno no está del todo claro, pueden presentar ciertas ventajas evolutivas. Por ejemplo, los estudios realizados en bacterias han mostrado una conexión entre el transporte de péptidos y la quimiostasis (Manson *et al.*, 1986), la esporulación (Mathiopoulos *et al.*, 1991; Perego *et al.*, 1991) y el reciclaje de los péptidos de la pared celular (Goodell y Higgins, 1987). Sin embargo, los sistemas de transporte de di/tripéptidos también pueden transportar varios agentes antifúngicos y antimicrobianos que afectan a la viabilidad celular (Georgiev, 2000). Los transportadores de pequeños péptidos son de gran interés por sus aplicaciones médicas, por ejemplo, en la búsqueda de drogas peptidomiméticas.

Uno de los transportadores de nitrato mejor caracterizado perteneciente a esta familia está codificado por el gen *NRT1.1 (CHL1)* de *A. thaliana* (Tsay *et al.*, 1993). Este transportador presenta afinidad dual por el nitrato y actúa como un transportador de alta afinidad o baja afinidad en función de su estado de fosforilación. La forma fosforilada se obtiene cuando la concentración externa de nitrato es baja. Así, en función de los niveles de nitrato en el ambiente radicular se produce la fosforilación/defosforilación del transportador lo que modifica sus propiedades funcionales (Wang *et al.*, 1998; Lui y Tsay, 2003). Además, Chl1 tiene un importante papel en las fases tempranas del desarrollo de órganos jóvenes como las puntas de las raíces, las raíces laterales nuevas y hojas incipientes (Guo *et al.*, 2001) y contribuye a que las plantas sean susceptibles a la sequía debido a su papel en la apertura estomática (Guo *et al.*, 2003). En 1994, un año después de la identificación de *CHL1*, se aislaron varios genes de transportadores de péptidos por clonaje funcional desde conejo, *PepT1* (Fei *et al.*, 1994), *A. thaliana*, *AtPTR2* (Frommer *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1996), *S. cerevisiae*, *PTR2* (Perry *et al.*, 1994) y la bacteria Gram-positiva *Lactococcus*

lactis, *DtpT* (Hagting *et al.*, 1994) que comparten similitud de secuencias con *CHL1*, lo que ha llevado a su agrupación en una nueva familia denominada NRT1 (PTR). Desde entonces *CHL1* y estos transportadores de péptidos han servido como prototipos en la búsqueda de genes homólogos en otros organismos. El mayor número de genes de la familia *NRT1 (PTR)* se ha identificado en plantas, como en *A. thaliana* donde se han obtenido 53 genes putativos, mientras que sólo se han hallado 6 miembros en humanos, 4 en el genoma de *Caenorhabditis elegans*, 3 en el genoma de *Drosophila*, y 2 en el genoma de levaduras (Chiang *et al.*, 2004). La abundancia de estos transportadores en plantas se ha atribuido al posible uso de hormonas peptídicas o bien a que los transportadores NRT1 (PTR) de plantas podrían transportar otros sustratos además de péptidos o nitrato (Chiang *et al.*, 2004).

Los análisis filogenéticos de los transportadores de nitrato y de péptidos de la familia NRT1 (PTR) permiten su clasificación en 4 grupos (Figura 6). El grupo I está formado por transportadores de bacterias, el grupo II está constituido por transportadores de animales, el grupo III por transportadores de hongos y en el grupo IV se agrupan los transportadores de plantas y los transportadores de histidina/péptidos de mamíferos. Los 4 grupos tienen diferente topología (Figura 6), aunque todos están constituidos por 12 dominios transmembrana. Los miembros del grupo I son compactos, con *loops* hidrofílicos cortos entre los dominios transmembrana, mientras que los miembros de otros grupos contienen un *loop* hidrofílico largo (~ 100 aminoácidos), que aparece entre el dominio 9 y 10 en el grupo II, entre el dominio 7 y 8 en el grupo III y entre el dominio 6 y 7 en el grupo IV (Chiang *et al.*, 2004).

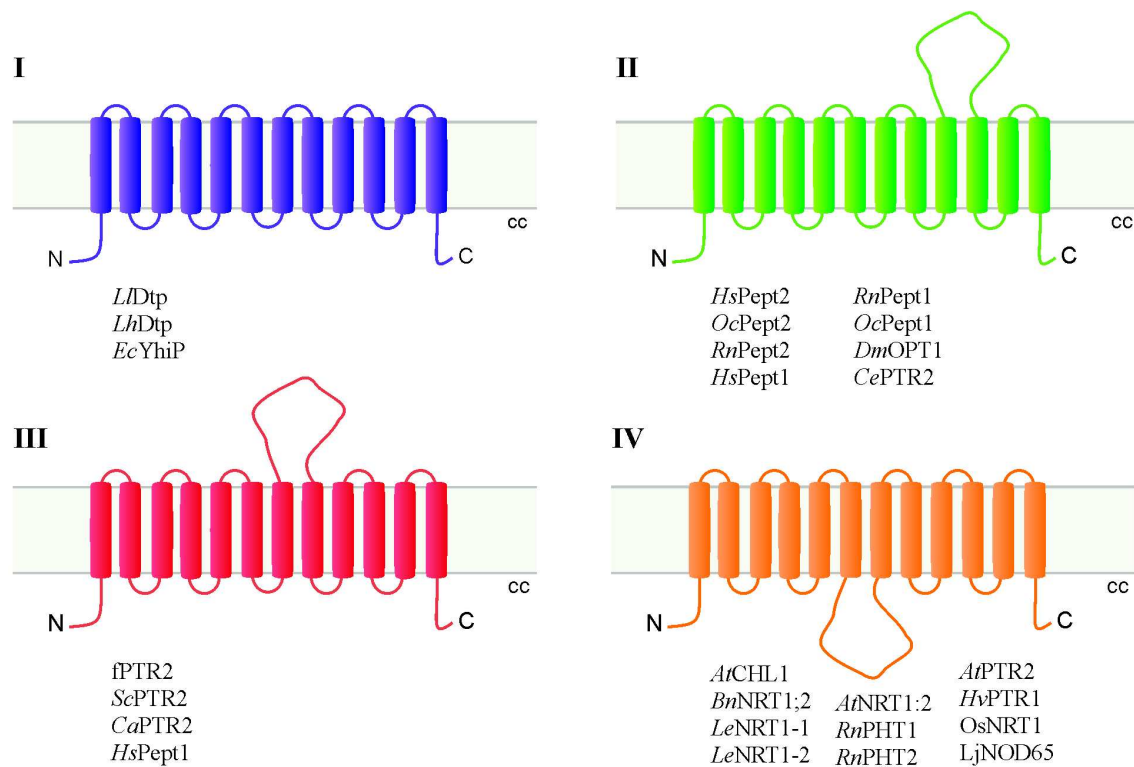


Figura 6. Clasificación de los transportadores de la familia NRT1 (PTR). *LIDtpT* y *LhDtpT* son transportadores de péptidos de *Lactococcus lactis* y *L. helveticus*, respectivamente; *YhiP* y *CePTR2* son transportadores de *E. coli* y *Caenorhabditis elegans*, respectivamente. *HsPept2*, *RnPept2* y *OcPept2* son transportadores de péptidos de riñón humano, de rata y de conejo. *RnPHT1* y *RnPHT2* son transportadores de péptido/histidina expresados en cerebro y en el sistema linfático de rata. *DmOPT1* es un transportador de péptido expresado en células de ovario de *Drosophila melanogaster*. El transportador *fPTR2* de hongos, *AtPTR2* de *A. thaliana*, *ScPTR2* de *S. cerevisiae*, y *CaPTR2* de *Candida albicans*, son transportadores de péptidos que complementan el transporte de péptido en un mutante de levadura. *HvPTR1* es un transportador de péptido de cebada (*H. vulgare*) aislado mediante el uso de primers degenerados. *CHL1* (*AtNRT1.1*) el transportador de nitrato de *A. thaliana* fue clonado en un mutante resistente a clorato. *BnNRT1;2* de nabo (*Brassica napus*) y *LeNRT1-1* y *LeNRT1-2* de tomate (*L. esculentum*) se clonaron a través de hibridación homóloga usando como sonda el ADNc de *CHL1*. *AtNRT1;2* de *A. thaliana* y *OsNRT1* de arroz (*Oriza sativa*) se aislaron mediante búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos EST utilizando la secuencia de la proteína *CHL1* de *A. thaliana*. *LjNOD65* es un gen específico de nódulo de *Lotus japonicus* de función desconocida. cc, cara citoplasmática. Adaptado de Chiang *et al.*, 2004.

Todos los miembros de los grupos I, II y III son transportadores de péptidos, mientras que el grupo IV engloba a transportadores de péptidos y nitrato. En base a la similitud de secuencias pueden ser fácilmente clasificados en dos subgrupos. Esto plantea la pregunta de si los transportadores de nitrato de esta familia pueden transportar péptidos y/o los transportadores de péptidos también pueden transportar nitrato. Para responder a la primera cuestión se estudiaron dos transportadores de nitrato de plantas de la familia NRT1 (PTR),

AtNRT1:2 y *OsNRT1*, obteniendo que ninguno de ellos transporta péptidos (Huang *et al.*, 1999). Para responder a la segunda pregunta se estudiaron dos transportadores de péptidos, *AtPTR2* (perteneciente al grupo IV) y *fPTR2* (del grupo III), determinando que ninguno de ellos realiza el transporte de nitrato (Chiang *et al.*, 2004). Por tanto, desde un punto de vista funcional, podría deducirse que la familia de transportadores de péptidos y de nitrato son dos subtipos de transportadores distintos de la familia NRT1 (PTR).

Sin embargo, existen evidencias de que estos transportadores realizan el transporte de nitrato y aminoácidos. En *B. napus* se ha identificado un transportador de nitrato de baja afinidad codificado por el gen *BnNRT1;2*. La expresión de este transportador en oocitos de *Xenopus* resultó en la asimilación de nitrato. Además de nitrato este transportador asimila diferentes moléculas que contienen nitrógeno, entre ellas histidina, aunque este transporte tiene lugar cuando la concentración del sustrato en el medio es elevada (Zhou *et al.*, 1998). *BnNRT1;2* presenta gran homología con *CHL1* tanto a nivel nucleotídico (85 % de identidad) como de secuencia aminoacídica (91 % de similitud). *BnNRT1;2* codifica una proteína de 589 aminoácidos y se clasifica dentro del grupo IV de la familia NRT1 (PTR). La topología de esta proteína es casi idéntica a la predicha para *CHL1* (Tsay *et al.*, 1993) y contiene el motivo consenso FY-X₂-IN-X-GSL descrito en la familia PTR (Zhou *et al.*, 1998; Paulsen y Skurray, 1994; Steiner *et al.*, 1995). Sin embargo, en *A. thaliana* el transporte de nitrato y de histidina tiene lugar a través de *CHL1* y *PTR2*, respectivamente (Frommer *et al.*, 1994).

El gen *PTR2* codifica el principal transportador de di/tripéptidos (Cai *et al.*, 2007) de la familia NRT1 (PTR) en *S. cerevisiae* cuya expresión depende de la disponibilidad y calidad de los nutrientes. La expresión de *PTR2* es inducida por ciertos aminoácidos, principalmente leucina y triptófano, y se reprime por fuentes de nitrógeno reducidas como el amonio (Island *et al.*, 1987), a través del represor transcripcional Cup9 (Byrd *et al.*, 1998).

3. 2. Familia NRT2 (NNP).

Las proteínas agrupadas en esta familia están presentes en bacterias y en diferentes eucariotas tales como levaduras (Ynt1 de *H. polymorpha*), hongos (CrnA de *A. nidulans*), algas (las proteínas Nrt2 de *C. reinhardtii*) y plantas superiores (como Bch1 y Bch2 de *H. vulgare*). Sin embargo, y con independencia del organismo al que hagamos referencia, las permeasas de nitrato de la familia NNP (*Nitrate Nitrite Porter*) transportan el nitrato desde el medio extracelular hacia el citoplasma, mientras que las permeasas de nitrito parecen estar implicadas principalmente en su excreción (Tabla 2).

Nombre	Descripción	Organismo	Nº de residuos	Nº de entrada	Base de datos ^a
CY04C12	Putativo excretador de NO ₂ ⁻	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	395	Z81360	GB
CY3G12	Putativo transportador de NO ₂ ⁻	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	515	Z79702	GB
MG294	Función desconocida	<i>Mycoplasma genitalium</i>	474	E64232	PIR
NarK	Excretador de NO ₂ ⁻	<i>Bacillus subtilis</i>	395	P46907	SP
NarK	Excretador de NO ₂ ⁻	<i>Escherichia coli</i>	463	P10903	SP
NarK	Putativo excretador de NO ₂ ⁻ (fragmento)	<i>Salmonella typhimurium</i>	130	P37593	SP
NarU	Excretador de NO ₂ ⁻	<i>Escherichia coli</i>	462	P37758	SP
NasA	Putativo transportador de NO ₂ ⁻	<i>Bacillus subtilis</i>	421	P42432	SP
Ynt1	Transportador de NO ₃ ⁻	<i>Hansenula polymorpha</i>	508	Z69783	GB
CrnA	Transportador de NO ₃ ⁻	<i>Aspergillus nidulans</i>	507	P22152	SP
Bch1	Putativo transportador de NO ₃ ⁻	<i>Hordeum vulgare</i>	507	U34198	GB
Bch2	Putativo transportador de NO ₃ ⁻	<i>Hordeum vulgare</i>	509	U34290	GB
Nrt2;1	Transportador de NO ₃ ⁻	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	547	S40142	PIR

Tabla 2. Miembros de la familia NNP. ^aSP, SwissProt; GB, GenBank; PIR, Protein Information Resource. Modificado de Pao *et al.*, 1998.

Uno de los miembros de la familia NNP mejor caracterizados en procariotas es el producto del gen *narK* de *E. coli*. Esta bacteria emplea el nitrato como aceptor de electrones durante la respiración anaerobia siendo el transportador NarK uno de los sistemas de transporte de nitrato de alta afinidad, que además es capaz de transportar nitrito (Jia y Cole, 2005) y excretarlo al

medio extracelular (DeMoss y Hsu, 1991). Por tanto, el transportador NarK realiza un antiporte de nitrato/nitrito lo que facilita la respiración anaeróbica del nitrato al existir un gradiente de concentración favorable a la entrada de nitrato. El potencial de membrana, negativo en el interior, es una barrera que impide la entrada pasiva de nitrato y la sincronización de la entrada del nitrato con la excreción del nitrito recién formado ayuda a mantener el balance electrogénico en la célula (DeMoss y Hsu, 1991). Por otra parte, no se ha descartado que en NarK tenga lugar la entrada de nitrato y la salida de nitrito por mecanismos de simporte de los respectivos aniones y H⁺ (Clegg *et al.*, 2006). Otro miembro de esta familia homólogo a *narK* es el transportador de nitrato NarU de *E. coli* que también transporta nitrito, aunque a una tasa mucho más lenta, y está implicado en la excreción de nitrito (Moir y Word, 2001; Jia *et al.*, 2009). La expresión de *narU* aumenta cuando el cultivo está en fase estacionaria, obteniendo la tasa máxima de excreción de nitrito. Por tanto, NarU transporta el nitrito intracelular procedente de la reducción del nitrato hacia el medio extracelular. Dado que su expresión tiene lugar en condiciones limitantes de oxígeno algunos autores han sugerido que este transportador ayuda a la adaptación de la bacteria desde el crecimiento aeróbico a la respiración anaeróbica del nitrato (Cole, 1996; Clegg *et al.*, 2002).

El primer miembro de esta familia clonado en eucariotas fue el gen *crnA* (*nrtA*) de *A. nidulans*. Este gen codifica una proteína de membrana agrupada dentro de la familia de transportadores de nitrato de alta afinidad (Unkles *et al.*, 1991; Unkles *et al.*, 2001; Forde, 2000). La estructura secundaria deducida de esta proteína de 57 kDa (507 aminoácidos), predice que está constituida por doce dominios transmembrana en conformación de α -hélice y conectan con *loops* hidrofílicos (Unkles *et al.*, 1991). Como característica única de los transportadores de nitrato de alta afinidad, CrnA presenta la secuencia consenso AAG-X-GN-X-GGG presente en el quinto y undécimo segmento transmembrana, reflejando la posible duplicación de los primeros seis segmentos transmembrana. Se cree que esta duplicación sucedió de forma temprana en la

evolución de las proteínas MFS (Pao *et al.*, 1998). Otras características de estos transportadores son los residuos con carga conservados dentro de las hélices hidrofóbicas: la arginina 87 (R87, del segundo segmento transmembrana) la arginina 368 (R368, del octavo segmento transmembrana), y el residuo aromático de la fenilalanina 47 (F47, localizado en el primer segmento). Otra característica más de CrnA de *A. nidulans* (aunque común entre los transportadores MFS) es su *loop* central, de aproximadamente 96 residuos, situados entre los segmentos sexto y séptimo (Forde, 2000). En plantas el *loop* está compuesto por un número menor de residuos aminoacídicos, con una longitud máxima de 32 aminoácidos. Además, CrnA presenta un extremo C-terminal hidrofílico y largo de 69 residuos necesario para la inserción y estabilidad de la proteína en la membrana plasmática (Kinghorn *et al.*, 2005).

En el alga unicelular *C. reinhardtii*, los sistemas de transporte de nitrato y nitrito de la familia NRT2 están codificados al menos por cuatro genes denominados *NRT2;1*, *NRT2;2*, *NRT2;3* y *NRT2;4*. El transportador *NRT2;1* es un componente del sistema de transporte I que transporta nitrato y nitrito con alta afinidad. *NRT2;2* es un componente del sistema de transporte II específico en el transporte de nitrato de alta afinidad. Estos sistemas de transporte están constituidos por otra proteína denominada NAR2 que resulta esencial para la actividad de transporte de *Nrt2;1* y *Nrt2;2* (Galván *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2000). El sistema III es un sistema biespecífico de alta afinidad de nitrato y baja afinidad de nitrito codificado por *NRT2;3* (Quesada *et al.*, 1998; Rexach *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2000). El sistema IV corresponde al transportador biespecífico de nitrato y nitrito de alta afinidad (Rexach *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2000). Los sistemas I, II y III son inducidos por nitrato y reprimidos por amonio mientras que el sistema IV tiene expresión constitutiva.

3. 3. Familia FNT.

En plantas la asimilación de nitrato ocurre a través de transportadores ABC, NRT1 y NRT2, mientras que la asimilación de nitrito se lleva a cabo por transportadores de las familias ABC, FNT (*F*ormate *N*itrite *T*ransporter) y NRT2 (Crawford y Glass, 1998; Moreno-Vivián *et al.*, 1999; Forde, 2000; Galván y Fernández, 2001; Moir y Wood, 2001).

La familia FNT, está presente en bacterias, arqueas, hongos y plantas. Las proteínas procariotas de la familia FNT transportan compuestos estructuralmente relacionados como el formiato y el nitrito (Suppmann y Sawers, 1994; Clegg *et al.*, 2002) mientras que las proteínas homólogas de levaduras podrían estar implicadas en el simporte de compuestos alifáticos de cadena corta/H⁺ como el formiato, el acetato y el propionato. La familia de transportadores formato-nitrito agrupa a proteínas integrales de membrana con un tamaño medio de 256 a 285 residuos aminoacídicos y de 6 a 8 dominios transmembrana (Suppmann y Sawers, 1994). Las proteínas procariotas mejor caracterizadas de esta familia son NirC y FocA de *E. coli*. NirC, homóloga a FocA, es una proteína integral de membrana con seis dominios en α -hélice implicada en la asimilación de nitrito (Jia y Cole, 2005). De hecho en ausencia de NarK, el transporte de nitrito mediado por NirC es suficiente para mantener la tasa máxima de reducción del nitrito a amonio (Clegg *et al.*, 2002). Los últimos estudios han determinado que NirC también está implicado en la excreción de nitrito (Jia *et al.*, 2009). Las primeras caracterizaciones bioquímicas de FocA ya apuntaban a que esta proteína era un canal implicado en el movimiento bidireccional de formiato (Suppmann y Sawers, 1994). Los estudios de cristalografía han revelado que FocA comparte la misma topología de membrana y el mismo tipo de plegamiento que las acuoporinas (Wang *et al.*, 2009), canales permeables al agua y al glicerol (Stroud *et al.*, 2003; Carbrey y Agre, 2009), aunque no comparten secuencias homólogas. El formiato, al igual que el CO₂ y el amonio, es una molécula pequeña clave en la evolución temprana de la vida.

FocA podría representar a un miembro de una antigua familia de canales responsables de la transferencia de pequeñas moléculas a través de las membranas celulares. La evolución de las proteínas canal que facilitan la transferencia de ácidos orgánicos a través de la membrana de la célula sin un requerimiento de ATP debía ser particularmente ventajosa a aquellos organismos que viven bajo condiciones fermentativas.

En organismos fotosintéticos un paso clave de la asimilación de nitrato ocurre dentro de los cloroplastos, donde el nitrito es reducido a amonio. En el alga unicelular *C. reinhardtii* se han descrito seis genes que codifican transportadores putativos de nitrito pertenecientes a la familia FNT (Rexach *et al.*, 2000; Galván y Fernández, 2001; Galván *et al.*, 2002; Mariscal *et al.*, 2004). El gen *CrNAR1;1* codifica una proteína de la membrana del cloroplasto implicada en el transporte de nitrito (Rexach *et al.*, 2000). La caracterización de cepas portadoras o carentes de este gen sugiere que NAR1;1 está involucrado en el transporte de nitrito en plastidios resultando fundamental en la supervivencia celular bajo condiciones limitantes de nitrato. Además, controla la cantidad de nitrato incorporado por las células bajo condiciones limitantes de CO₂ (Rexach *et al.*, 2000). Por tanto, existe una coordinación entre la membrana plasmática y este transportador de nitrito con el fin de asegurar una asimilación de nitrato óptima de acuerdo a la disponibilidad de C y N.

El gen *CrNAR1;1* codifica un polipéptido de 355 residuos con un péptido de tránsito de cloroplasto (Franzén *et al.*, 1990). La secuencia genómica está interrumpida por 4 intrones, con secuencias de splicing en sus terminales 5' ([[(G,T)/GTGNG]) y 3' (CAG/G). La región promotora que podría abarcar 1390 pb, contiene una caja TATA en la posición -47, dos motivos de transcripción dependientes de nitrato correspondientes a secuencias ricas de AT seguidas por (G,A)(G,G)TCA (Hwang *et al.*, 1997) y varias secuencias GATA. La proteína madura de NAR1;1 de 263 aminoácidos presenta similitud con los transportadores de formiato de *E. coli* (32%) y *Methanobacterium phormicum*

(31%) (Rexach *et al.*, 2000). NAR1;1 presenta similitud con las proteínas integrales de membrana de bacterias FocA (Suppman y Sawers, 1994) y NirC (Peakman *et al.*, 1990). La proteína FocA ha sido propuesta como un canal de formiato, y de hecho, los mutantes que carecen de dicha proteína son deficientes en su transporte (Suppman y Sawers, 1994). Aunque NirC es un transportador de nitrito, no se han descrito fenotipos asociados a su mutación (Cole, 1996). Estas proteínas de bacterias y NAR1;1 de *C. reinhardtii* muestran un perfil de hidrofobicidad muy similar (Kyte y Doolittle, 1982), con 6 segmentos transmembrana (Figura 7) dentro de los cuales aparece la mayor conservación entre las secuencias, especialmente en los dominios transmembrana 4 y 5.

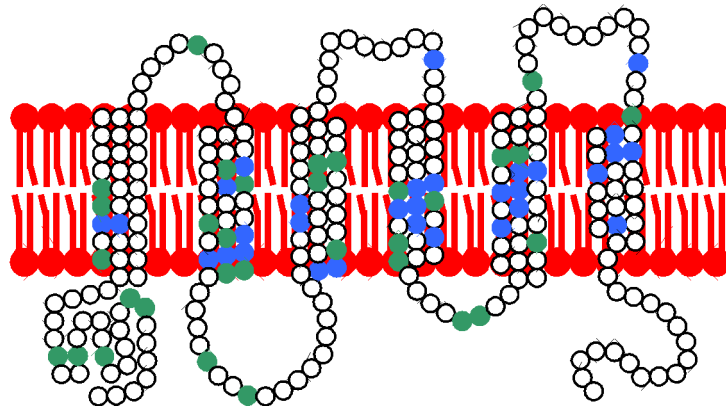


Figura 7. Topología del transportador de la membrana del cloroplasto NAR1;1 de *C. reinhardtii*. Los residuos conservados entre las proteínas CrNAR1 se representan en color verde y los residuos conservados entre las proteínas CrNAR1 y la familia FNT se representan en color azul. Modificado de Galván *et al.*, 2002.

4. Transporte de nitrato y nitrito en *H. polymorpha*.

H. polymorpha presenta un transportador de alta afinidad, Ynt1 (iHANT), que constituye el principal transportador de nitrato desde un punto de vista cuantitativo. Además, Ynt1 transporta nitrito con elevada afinidad y por ello está englobado dentro de la familia NNP. No obstante, la levadura tiene un transportador específico de nitrito de alta afinidad independiente de Ynt1 (Machín *et al.*, 2004). Como ya se ha mencionado, los transportadores de esta familia tienen en común la presencia de doce hélices que atraviesan la membrana, y presentan en la región citosólica los dominios amino y carboxilo-

terminal. El extremo C-terminal es corto y entre el sexto y el séptimo dominio transmembrana hay un *loop* central hidrofílico (Pérez *et al.*, 1997; Machín *et al.*, 2004). Es en este dominio central donde se produce la ubiquitinación y fosforilación del transportador. En presencia de glutamina Ynt1 es ubiquitinado en los residuos de Lys-253 y 270 del *loop* central desencadenando la endocitosis y degradación vacuolar (Navarro *et al.*, 2006). En condiciones limitantes de nitrógeno se produce la fosforilación de la Ser-246 del *loop* central que implica la llegada del transportador desde la ruta biosintética a la membrana plasmática (Navarro *et al.*, 2008).

Las características topológicas de Ynt1 son similares al transportador de nitrato de *A. nidulans*, CrnA, y difieren de los transportadores de nitrato de plantas. Son varios los organismos que presentan más de un transportador de nitrato de alta afinidad. En *A. nidulans* se conoce otro transportador de nitrato de alta afinidad llamado NrtB (Unkles *et al.*, 2001) y en *C. reinhardtii* se han descrito cuatro sistemas de transporte de nitrato y nitrito (Navarro *et al.*, 2000; Galván *et al.*, 1996; Rexach *et al.*, 1999). Sin embargo, como ya se ha comentado, Ynt1 es el único transportador de nitrato de alta afinidad en *H. polymorpha*. Nuestro grupo ha obtenido evidencias sobre el transporte de nitrato de baja afinidad en esta levadura (Machín *et al.*, 2001). A diferencia de lo observado en las mutaciones de *YNR1* e *YNA1*, la mutación del gen *YNT1* no impide el crecimiento de la levadura en presencia de nitrato. Por tanto, *H. polymorpha* transporta nitrato independientemente de Ynt1. Las cepas que carecen de actividad nitrito reductasa ($\Delta yni1$) excretan nitrito al medio cuya cuantificación permite estimar el flujo de entrada de nitrato. En la cepa $\Delta ynt1$ la cantidad de nitrito excretada depende de la concentración de nitrato extracelular. La cinética de excreción de nitrito mostrada por esta cepa implica la existencia de un sistema (o sistemas) de transporte de baja afinidad de nitrato, ya que la mayor excreción se alcanza cuando la concentración de nitrato en el medio extracelular es alta. Así en la cepa $\Delta yni1$, que no está afectada en el transporte de NO_3^- , la excreción de nitrito es máxima a una concentración de nitrato de 0,1 mM;

mientras que en la cepa $\Delta[ynt1, yni1, yna1, ynr1]$ P_{MOX} -YNR1 la excreción es máxima cuando la concentración de nitrato es 10 mM (Machín *et al.*, 2001).

El nitrito es menos abundante que el nitrato y resulta más tóxico para las plantas. Sin embargo, podría ser un componente importante en los ecosistemas donde viven las levaduras y otros microorganismos. Hasta el momento no se ha clonado ningún transportador de nitrito de alta afinidad en *H. polymorpha*. Aún así, los estudios desarrollados en nuestro grupo indican que el transporte de nitrito podría ser llevado a cabo por el transportador de baja afinidad de nitrato, o bien por otro transportador independiente del transporte de nitrato. Aún así, se desconoce cuál es la entidad molecular responsable de dicho transporte.

Los experimentos realizados por Machín *et al.*, (2001) muestran que la cepa $\Delta ynt1$ excreta nitrito al añadir nitrato al medio. Sin embargo, esta excreción disminuye cuando la concentración de nitrato es elevada. Una posible explicación para este comportamiento es que el propio nitrito inhibe o inactiva algún paso de la ruta, desde la toma de nitrato hasta la propia excreción del nitrito. Los resultados obtenidos mostraron que podría existir una inhibición por parte del nitrito sobre el transporte de nitrato independiente de Ynt1 (Figura 8A). Otra posible explicación para la disminución de la excreción del nitrito en esta cepa es que éste es transportado al interior celular una vez que es excretado. En resumen, en *H. polymorpha* existe transporte de nitrito independiente de Ynt1. Este transporte puede ser llevado a cabo por algún transportador específico de nitrito, o bien por el transportador (o transportadores) de baja afinidad de nitrato, comportándose en este caso como un sistema biespecífico (Figura 8B).

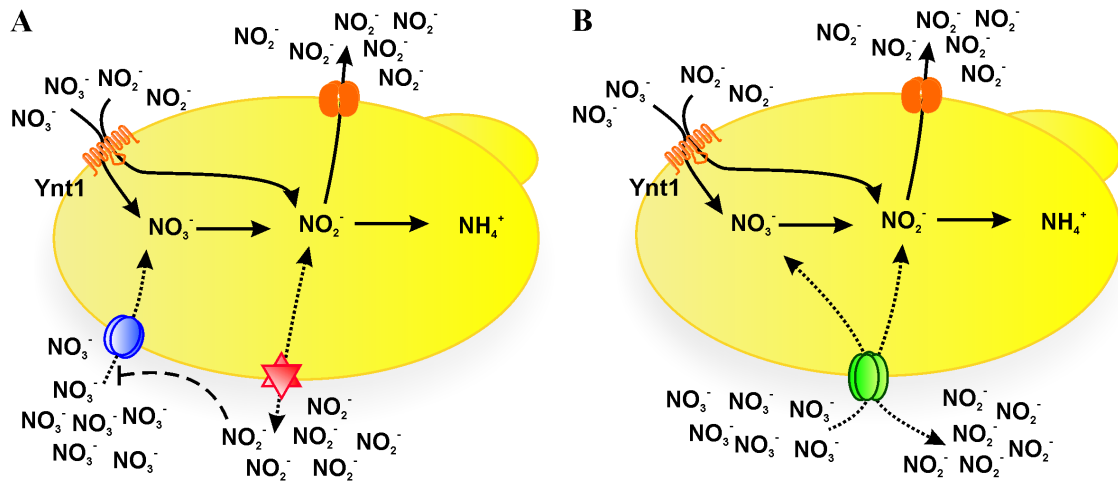


Figura 8. Modelos propuestos para el transporte de nitrato de baja afinidad y de nitrito de alta afinidad en *H. polymorpha*. **A.** El transporte de baja afinidad de nitrato y la excreción de nitrito se realizan por sistemas independientes, siendo el nitrito excretado el que inhibe al transportador de NO_3^- de baja afinidad. **B.** El transporte de nitrato de baja afinidad y la excreción de nitrito ocurren a través del mismo sistema. La excreción es el componente de flujo hacia el exterior de un transportador de alta afinidad de nitrito.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

Crecientes evidencias sugieren que el transporte neto de nitrato/nitrito depende de la entrada y de la salida de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ de la célula. En la levadura *H. polymorpha* el flujo de entrada de estos aniones tiene lugar principalmente a través de Ynt1, aunque se ha observado transporte de nitrato de baja afinidad y de nitrito de alta afinidad independientemente de Ynt1, si bien desconocemos los transportadores implicados (Machín *et al.*, 2004). Por otro lado, los sistemas de excreción de nitrato y de nitrito han recibido escasa atención, o bien han sido completamente ignorados. La disponibilidad y el acceso al genoma de *H. polymorpha* nos ha permitido buscar nuevos transportadores de nitrato y nitrito mediante un enfoque bioinformático. La identificación de dichos sistemas es necesaria para conocer los flujos netos de transporte de estas fuentes nitrogenadas y con ello su asimilación neta. Por este motivo los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Rastreo en el genoma de *H. polymorpha* de genes con similitud de secuencia a los transportadores de nitrato y nitrito de diferentes organismos.
2. Caracterización de la función de las proteínas que codifican *NARI* y *CHLI*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS

La búsqueda de los genes que codifiquen transportadores de nitrato de baja afinidad y nitrito de alta afinidad en el genoma de *H. polymorpha* se realizó usando la secuencia de diferentes transportadores de nitrato y nitrito como sondas. En la búsqueda *in silico* utilizamos la base de datos de *H. polymorpha* propiedad de la empresa privada Reinbiotech (Alemania). El resultado de esta búsqueda aportó dos genes candidatos que denominamos *HpCHL1* y *HpNAR1*, cuya secuencia aminoacídica tiene similitud con transportadores de nitrato de baja afinidad y de nitrito de alta afinidad, respectivamente.

Las funciones Chl1 y Nar1 y su importancia en la vía de asimilación de nitrógeno en *H. polymorpha* se muestran en los apartados de resultados.

1. Nar1 participa en la excreción de nitrato y de nitrito en *H. polymorpha*.

Nar1 está implicada en la excreción de nitrato y nitrito en *H. polymorpha*. El flujo de entrada de dichas fuentes alternativas en la levadura es superior a la capacidad de asimilación, lo que deriva en la generación de intermediarios tóxicos, como el nitrito y el amonio. Estos compuestos son excretados al medio evitando su efecto tóxico y, en consecuencia, permite la supervivencia celular.

1. 1. El genoma de *H. polymorpha* codifica la proteína Nar1.

El transporte y la reducción del nitrato en *H. polymorpha* se lleva a cabo mediante el transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad (Ynt1); la nitrato reductasa (Ynr1) que cataliza la reducción del nitrato a nitrito y la nitrito reductasa (Yni1) que reduce el nitrito a amonio. Los genes que codifican estas proteínas se encuentran agrupados en el genoma y junto a ellos están los genes *YNA1* e *YNA2* que codifican factores transcripcionales implicados en la inducción de *YNT1*, *YNR1* e *YNI1* en nitrato. Por tanto, la entrada de nitrato en la levadura tiene lugar a través de Ynt1 cuando este compuesto está presente en el medio. Sin embargo, *H. polymorpha* es capaz de crecer en presencia de nitrato y de nitrito aún en ausencia de Ynt1, por lo que la asimilación de estos compuestos tiene lugar a través otros sistemas ajenos a Ynt1. Los genes que codifican dichos sistemas de asimilación independientes de Ynt1 no se han identificado, si bien la asimilación de nitrato y nitrito obtenida en la cepa $\Delta ynt1$ determina la presencia de al menos un sistema de nitrato de baja afinidad y un sistema de transporte de nitrito de alta afinidad. Por otra parte, una característica de *H. polymorpha* es la excreción de nitrito cuando el nitrato está presente en el medio a concentraciones milimolares. Dicha excreción tiene lugar a través de sistemas de transporte desconocidos.

Para la identificación *in silico* de posibles genes que codifiquen proteínas con similitud a transportadores de nitrato y nitrito de alta afinidad se realizó una búsqueda en el genoma de *H. polymorpha*, usando transportadores de algas, plantas, hongos y bacterias (ver Tabla 3) mediante el programa BLAST con la matriz BLOSUM62. El alineamiento de secuencias divergentes que realiza esta matriz permite detectar similitudes entre secuencias distantes, que compartan menos de un 62 % de identidad, por lo que es útil en la obtención de dominios conservados. Los resultados de estos análisis aportaron una única proteína que denominados Nar1 obtenida a partir de la comparación de los transportadores de nitrito *CrNAR1* de *C. reinhardtii*, FocA y FocB de *E. coli* y un putativo transportador de formiato/nitrito de *Synechococcus* sp, todos ellos pertenecientes a la familia de transportadores de formiato y nitrito, FNT (de Formate Nitrite Transporter). Sin embargo, con los transportadores de alta afinidad de nitrato de plantas y hongos y algunos transportadores de nitrito de bacterias no se obtuvieron secuencias similares en la base de datos del genoma de *H. polymorpha* (Tabla 3).

Gen	Especie	Familia	Sustrato	GeneBank
<i>CrNAR1.1</i>	<i>C. reinhardtii</i>	FNT	NO ₂ ⁻	XP_001696698.1
<i>CrNAR1.2</i>	<i>C. reinhardtii</i>	FNT	NO ₂ ⁻ /HCO ₃ ⁻	XP_001691213.1
<i>CrNAR1.3</i>	<i>C. reinhardtii</i>	FNT	?	AAT39458.1
<i>CrNAR1.4</i>	<i>C. reinhardtii</i>	FNT	?	AAT39455.1
<i>CrNAR1.5</i>	<i>C. reinhardtii</i>	FNT	?	XP_001694067
<i>CrNAR1.6</i>	<i>C. reinhardtii</i>	FNT	Posiblemente NO ₂ ⁻	AAT39457.1
<i>HvNRT2;1</i>	<i>H. vulgare</i>	NRT2 (NNP)	NO ₃ ⁻	AAC49531.1
<i>HvNRT2;2</i>	<i>H. vulgare</i>	NRT2 (NNP)	NO ₃ ⁻	AAC49532.1
<i>LjNRT2</i>	<i>Lotus japonicus</i>	NRT2	?	CAC35729.1
<i>OsNRT2</i>	<i>Oryza sativa</i>	NRT2	NO ₃ ⁻	BAA33382.1
<i>BnNRT2</i>	<i>Brassica napus</i>	NRT2	NO ₃ ⁻	CAC05338.1
<i>ZmNRT2.2</i>	<i>Zea mays</i>	NRT2	?	AAT66252.1
<i>NpNRT2</i>	<i>N. plumbaginifolia</i>	NRT2	?	CAA69387.1
<i>crnA</i>	<i>A. nidulans</i>	NRT2 (NNP)	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	AAA76713.1
<i>narK</i>	<i>Escherichia coli</i>	NRT2 (NNP)	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	CAA34126.1
<i>focA</i>	<i>E. coli</i>	FNT	NO ₂ ⁻ , formiato	CAQ31432
<i>focB</i>	<i>E. coli</i>	FNT	?	NP_416987.1
<i>nirC</i>	<i>E. coli</i>	FNT	NO ₂ ⁻	YP_542831.1
<i>nirC</i>	<i>Yersinia pestis</i>	FNT	?	NP_991562.1
<i>Syncc9605</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	FNT	?	ABB36382.1

Tabla 3. Genes usados en la búsqueda de transportadores de nitrito de alta afinidad en *H. polymorpha*. Algunos de estos genes codifican transportadores de nitrato y/o nitrito de alta afinidad, mientras que otros codifican putativos transportadores de nitrito.

La secuencia 5'-TTGATGG-3' con la que se inicia la traducción del gen *HpNAR1* se ajusta a la secuencia consenso 5'-(A/G)NNATGG-3' propuesta como señal de inicio de la traducción en levaduras (Kozak, 1981). El estudio de la región codificante del gen *HpNAR1* mostró la existencia de una pauta de lectura abierta de 1428 pb. El análisis de 800 pb de la región promotora del gen *HpNAR1* a través de la base de datos SCPD (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>) mostró varios sitios de unión de diferentes factores transcripcionales, entre ellos Gcr1 (-

762/-758; -123/-119 y -49/-53), Gcn4 (-338/-333 y -315/-310), Pho2 (-796/-789) y Scb (-304/-298) (Figura 9). El factor Gcr1 activa la transcripción de tres clases génicas que influyen en el crecimiento y la progresión del ciclo celular: las enzimas glucolíticas, las proteínas ribosómicas y las ciclinas (Deminoff y Santangelo, 2001; Willis *et al.*, 2003; Barbara *et al.*, 2007). El factor transcripcional Gcn4 se activa en respuesta al ayuno de aminoácidos, incrementando la transcripción de los genes que codifican las enzimas implicadas en vías biosintéticas de aminoácidos (Arndt y Fink., 1986; Zaman *et al.*, 1999). Pho2 es necesario para la expresión de genes de diferentes vías como la biosíntesis de purinas y de histidina y la utilización de fosfato. Controla la expresión de diversos genes como *PHO5* que codifica la principal fosfatasa ácida cuya expresión se induce en condiciones de escasez de fosfato (Oshima, 1997; Lenburg y O'Shea, 1996); *HIS4* que codifica un polipéptido multifuncional con actividad fosforribosil-ATP pirofosfatasa, fosforribosil-AMP ciclohidrolasa e histidinol deshidrogenasa cuya carencia causa auxotrofia a histidina (Alifano *et al.*, 1996); y los genes *ADE1*, *ADE2*, *ADE 5*, *7* y *ADE8*, todos ellos implicados en la biosíntesis *de novo* de los nucleótidos de purinas (Liu *et al.*, 2000). El factor Scb, formado por las proteínas Swi4 y Swi6, activa la expresión de genes de ciclinas que controlan la transición de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular (Koch *et al.*, 1993).

ACATAATTTACATCTATTACGATCACATAAACGAGTACCATCCGCTATTG - 800
TGTATTTAAATGTAGATAATGCTAGTGTATTTGCTCATGGTAGGGGATAAC

GCGGGAGCTCTTCTAGGAGCGCAAACGTCATGTCTGGCGCAGTCGTTGAA - 750
CGCCCTCGAGAAGATCCTCGCGTTTGCAGTACAGACCGCGTCAGCAACT

CCAATTTTACCAACGCACAATCAGTCTATCTAAGCATATCAAATTTTATA - 700
GGTTAAATGGTTGCGTGTAGTACAGATAGATTTCGTATAGTTTAAATAT

TCTACGGAATATTCAACGGAGCAGCTACCACTTTATGGATTAGGTTGCTG - 650
AGATGCCTTATAAGTTGCCCTCGTCGATGGTGAATACCTAATCCAACGAC

GTGTCTAAGGTAGACACCAAATCATGAGGTTTGTGTACGATCAGACATT - 600
CACAGATTCCATCTGTGGTTTGTAGTACTCAAACACATGCTAGTCTGTAA

TGGTGGGCTCATGTTTCAATTCCTTGTTCATTTTGTATAACTGTATCTGGG - 550
ACCACCCGAGTACAAAGTTAAGAACAAGTAAAACATATTGACATAGACCC

AACGGCAGGACCTTTACACCCATTTACGAACAACATATATCCAGTCGCTC - 500
TTGCCGTCCTGGAAATGTGGTAAATGCTTGTGTATATAGGTCAGCGAG

AAGTACTACTACATGATGTGGCGTTGGTGTGTCGATCTATGCTTTTTTCCA - 450
TTCATGATGATGTACTACCGGCAACCACAGCATAGATACGAAAAAGGT

TATGCGTGAAGATCTCATATTCCCGCTCAACTGTTTGTGACCCCTCATAT - 400
ATACGCACTTCTAGAGTATAAGGGCGAGTTGACAAACAGCTGGGAGTATA

TCACGCTGCTACTGACTCTGATCACGTAATAGAAATGACTTTGTGCGCGG - 350
AGTGCAGCATGACTGAGACTAGTGCATTTATCTTACTGAAACAGCGCGC

AAAATGCATGTTCCCTTAATTTATTTGCGCCTTTAACGGGAGTTTTGCCTGG - 300
TTTTACGTACAAGGAATTAATAACCGGAAATTGCCCTCAAACGGACC

TATATTTTGTATTCGTTACGTAATAACAGTTTATCCGAAAAGCGGCCCAA - 250
ATATAAAACTAAAGCAATGCATTTTGTCAAATAGGCTTTTCGCCGGGGTT

AAACGTTAAACTTTCCAGCACAGTATACACACACCTGAGACCCGACACC - 200
TTTGCAATTTTGAAAGGTCGTGCATATGTGTGTGGACTCTGGGCTGTGG

CCTACAGCCACACCTTACACCAGCAAACATCCAATCATGATCACCGGGTA - 150
GGATGTCCGGTGTGGAAATGTGGTCGTTTGTAGGTTAGTACTAGTGGCCAT

AGACGGACTCAAGCTTGCAAGCGTTCAAAAAGGAGCCACAAGGGGTGGGA - 100
TCTGCCTGAGTTCGAACGTTTCGCAAGTTTTTCTCGGTGTTCCCAACCT

AGCTTGGAAATCATTTCCCTTTAGATTCGAAATTTTTCCGCAATACTGTTG - 50
TCGAACCTTAGTAAAGGAAATCTAAGACTTTAAAAGGCGTTATGACAAC

Figura 9. Secuencias de unión de los factores transcripcionales identificadas en el promotor de *HpNARI*. Se analizan 800 nucleótidos de la región 5' no codificante del gen *HpNARI* representando las secuencias de unión de Gcr1 en amarillo, Gcn4 en verde, Pho2 en rojo y Scb en azul.

1. 1. 1. *HpNARI* codifica el único transportador de la familia FNT en *H. polymorpha*.

El 92 % de los genes de codifican transportadores de la familia FNT están presentes en procariotas, y el 8 % restante se ha identificado en hongos, algas, levaduras y protozoos. En *E. coli* se han identificado varios de estos genes (*focA*, *focB* y *nirC*) y en eucariotas es *C. reinhardtii*, con un total de seis genes, el organismo que tiene la máxima representación de este tipo de genes (Mariscal *et al.*, 2006). Sin embargo, en la mayoría de los organismos los genes FNT aparecen en una sola copia o en dos, como en *Staphylococcus aureus* (Mariscal *et al.*, 2006). La posibilidad de que existan más genes FNT en el genoma de *H. polymorpha* nos llevó a ampliar su búsqueda mediante *southern blot*, ya que la base de datos no contenía la secuencia total del genoma. Con el fin de conocer la posible presencia de más miembros de la familia FNT en el genoma de *H. polymorpha*, se empleó la secuencia del gen *HpNARI* como sonda en la hibridación. Se emplearon condiciones permisivas durante la hibridación y los lavados de la sonda con el fin de identificar genes homólogos de *HpNARI*. En la Figura 10 se muestra el resultado del *southern blot*, a partir del cual podemos concluir que Nar1 parece ser el único gen que codifica miembros de la familia FNT en esta levadura.

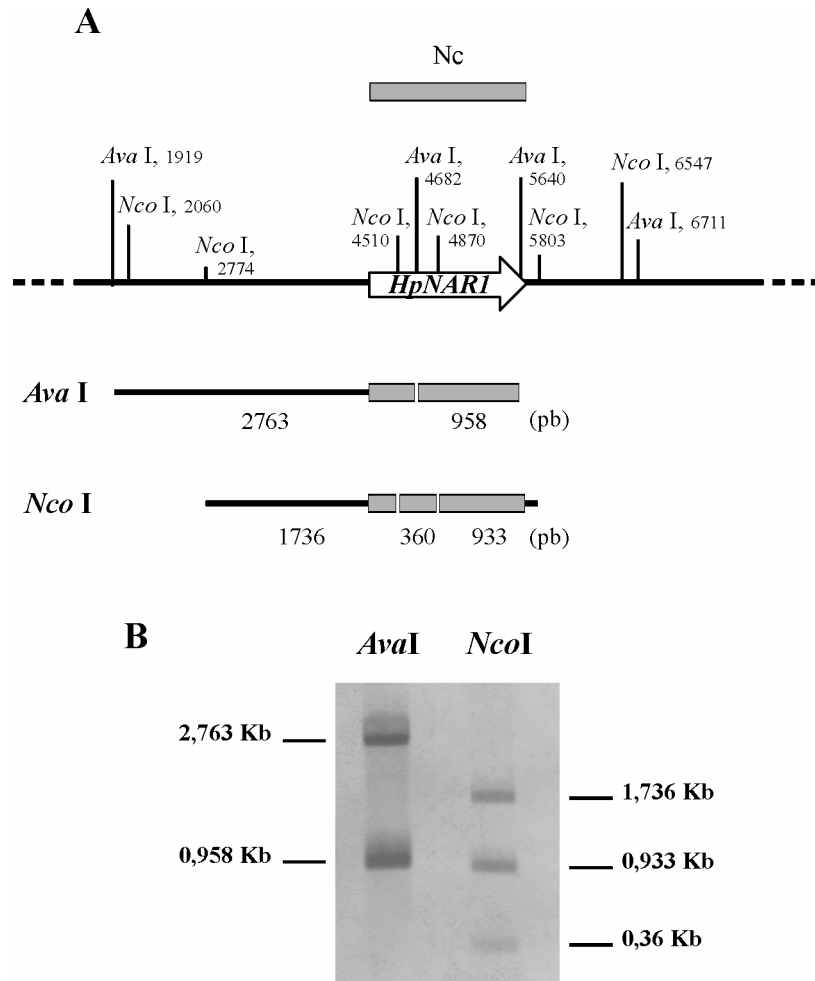


Figura 10. A. Mapa de restricción de *HpNARI* en el genoma de *H. polymorpha*. Se muestran las dianas empleadas en la digestión del ADN genómico de la cepa NCYC495 así como la región que es reconocida por la sonda Nc de 1440 pb. Se representan también los valores de las bandas obtenidas en el reconocimiento de *HpNARI* en cada caso. **B. Resultados del análisis *southern blot* con la sonda Nc en el ADN genómico de la cepa silvestre.** El ADN genómico se sometió a digestión total con las enzimas de restricción indicadas y los fragmentos se separaron mediante electroforesis. Las condiciones de hibridación fueron de 37 °C al 40 % de formamida; y las de lavado de la sonda fue una vez a temperatura ambiente con SSC 2X; SDS 0,1 % y dos veces a 42 °C en el mismo tampón.

1. 2. Caracterización de la proteína Nar1 de *H. polymorpha*.

La secuencia de aminoácidos codificada por *HpNARI* se obtuvo a partir del servidor ExPaSy (<http://web.expasy.org/translate/>). Empleando esta herramienta se determinó la presencia de dominios conservados usando la aplicación InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk>). Nar1p presenta un dominio, comprendido entre el residuo 11 hasta el 262, con similitud al presente en las proteínas agrupadas en la familia FNT.

Los miembros de la familia FNT están presentes en la mayoría de los filos de bacterias, en arqueas y en eucariotas inferiores, tales como el alga unicelular *C. reinhardtii* (Rexach *et al.*, 2000), la levadura *S. cerevisiae* (Suppman y Sawers, 1994; Jennings y Cui, 2008) y el protista *Euglena gracilis* (Delómenie *et al.*, 2007). Las proteínas de procariotas de la familia FNT intervienen en el transporte de compuestos estructuralmente relacionados con el formiato (Falke *et al.*, 2010) y el nitrito (Peakman *et al.*, 1990; Clegg *et al.*, 2002; Jia y Cole, 2005; Jia *et al.*, 2009). En *S. cerevisiae* el gen *YHL008c* codifica una proteína homóloga a los transportadores de formiato y nitrito bacterianos. Inicialmente se describió como un H⁺ simporte de acetato (Paulsen *et al.*, 1998). En estudios posteriores se ha determinado que carece de la función de transportador de monocarboxilatos (Makuc *et al.*, 2001) y ha sido propuesta como un sensor que, o bien se activa si la concentración extracelular de Cl⁻ disminuye, o transmite la señal activando finalmente al transportador de Cl⁻ (Jennings y Cui, 2008).

La proteína Nar1 de *H. polymorpha* comparte entre el 19 al 29 % de identidad con los transportadores de formiato y nitrito de bacterias (Suppman y Sawers, 1994; Nolling y Reeve, 1997; Peakman *et al.*, 1990) y entre el 12 al 23 % con las seis proteínas NAR1 de *C. reinhardtii* (Mariscal *et al.*, 2006). El empleo de los alineamientos locales nos ha permitido identificar las regiones que comparten la mayor similitud entre Nar1 y las proteínas de bacterias y de *C. reinhardtii*, siendo dichas zonas las correspondientes a los respectivos dominios FNT (Figura 11 A). Además, Nar1 de *H. polymorpha* tiene una elevada identidad con el transportador YHL008c de *S. cerevisiae* y un transportador de función desconocida de *Candida albicans*. Los alineamientos múltiples así como las principales características de estas proteínas se muestran en la Figura 11 B.

B

	Similitud	Identidad	Nº de residuos	Dominio FNT	GenBank
HpNar1	--	--	476	11-262	--
<i>S. cerevisiae</i>	67 %	43 %	627	24-262	AA56428.1
<i>C. albicans</i>	71 %	42 %	467	23-261	CAA21934.1

<i>H. polymorpha</i>	MADDTYYLTVEHAALAVVATAMKKSRCLKPHILVINSIIGAFLEFSSGGMLDLMVHALNPGI	60
<i>S. cerevisiae</i>	MVDDSNYLTPHETALAVVATAMKKARLQDITLLINSILGGVLFSSGSLLVAVYSEDPDI	60
<i>C. albicans</i>	-MDDNLYLTTEAALAVVATAMKKARLRIDVLVINSIMGGMLFTTGGMLYDLIRAGFSGI	59
	*. * . : * : * * * * * * * * * * * * . * : * * * : * . * * : * . * : * : . . .	
<i>H. polymorpha</i>	VHGFVGVVSLQGSVYSIGLFFVISMGMELFNSNVLFSSVGVMRGAVSVVDLLTSWVFS	120
<i>S. cerevisiae</i>	VAR-NPGIVNLTGVNFAMGLFYVMMGADLFNSNILEFSSVGVLRKAVTIYDLMSWVVS	119
<i>C. albicans</i>	NET-NPGVISLLQGICYPIGLFYVILGVDLFNSNILEFSTALCRGAVSFLDLFI SWVFS	118
	* : : * : * : : * * * : * : * : * * * * * * * * : * * * : * * : * * * * *	
<i>H. polymorpha</i>	LWVNLGATVFVYLFCHVSGITSSGSYVEESRAIAEDKEAFSFMQTFLLKGVAGNFFVCLA	180
<i>S. cerevisiae</i>	WLGNIAGSLFVSYLFGHLSGISQKLIWIGSRQIIEQKVSYSFVQTFLLKGIACNFFVCLA	179
<i>C. albicans</i>	WWFNLVGNIFVCIYFCYISDVVRTQLMVVGSVEVAVQKAESTFVETLLKATAGNFVCLA	178
	* : . . : * * * * * : * : . . : * : * : * : * : * * : * * : * * : * * * * *	
<i>H. polymorpha</i>	VYLQIMVKPLHVKLIMYLPITFTVAMGFTHCVADMFLVPVGLLNKCSFGWGRYFWKLF	240
<i>S. cerevisiae</i>	IYLQLMAKPIHVKFIKLSFPIIDFIGIGFTHVVGDMASFIAMLNANVSVGKIYWKLLI	239
<i>C. albicans</i>	IFLQLMAKPLHVKFLMMLLPVFTFVAMGFTHSVADMFLVTMGLINGAPISVGKAARKVFL	238
	: : * * : * * * * * * * : : * : * : * * * * * * * * : : : * . . . * : * * : :	
<i>H. polymorpha</i>	PATLGNIVGGSFFGVVWPWYLHLVVEIKDMKQLHLPDYEERDEQPELNMDSRVVRAP---	297
<i>S. cerevisiae</i>	PASLGNIVGGLFFSAVVPFYLHLVVVERDRKRLSLPEYEARDEQPELNMDSRVVRIQKNE	299
<i>C. albicans</i>	PGAIGNIIGGSFFGVVITWYLIHYVVERDRAALNLPQYELRDEQPELNQDSRVVRKK---	295
	* : : * * * * * * * * . * . : . : * * : * : * * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>H. polymorpha</i>	-----SHSAVTSLSNSTINYN	312
<i>S. cerevisiae</i>	CDDDATETGEDLENLTKEGFASIYNTNHDNSSYFTGRSLNSLRSIPSSVITSDNVTMESD	359
<i>C. albicans</i>	-----SPRMEDEVVHTNK	308
	*	
<i>H. polymorpha</i>	PPDVQAYAP---STTE-----RSPSGVFPVYDMGE	339
<i>S. cerevisiae</i>	LGEFVQFIPKSNSTTRSPHLGLPHNLPHNSIKSINRHRINKRHSLSRPPGVFPVRGMGE	419
<i>C. albicans</i>	FDDSEESEE-----IQAPEDFYPTFPVYDE	332
	: : * . . : * . *	
<i>H. polymorpha</i>	PLERERSIAQATEDGAGLRLSLTRGSWRRRATQADA---EAQSDTGSRSQETTKDR---	392
<i>S. cerevisiae</i>	PLEREKTIEDATYDPKENELFLRRAETHNSAYVKNK---KKEDDNLRLVKTEDREQKE	476
<i>C. albicans</i>	TSIQSYRLTHRKTDRSISLSRSTRSRPKNVFPVYGMGAPLKRERTIAGEVSTPAEP---	388
 * * *	
<i>H. polymorpha</i>	-----IVRHLSSARSRDDMDAMRKLSAAGITSKIASHSNDIAGIHEGSIDVSYPGP	444
<i>S. cerevisiae</i>	YEKNGGYNILENKPGTRLEKIITHLAENVSSREVTPIIPRTTQDTFPHNAPASSPAYTD	536
<i>C. albicans</i>	-----MDEKLEEEAEYIGTRLRKAINRSKVSLEANK-----SPSNHGSROPTP	433
	: . . . : : * . . :	
<i>H. polymorpha</i>	TASRLRRLPTESVD-----PADSP-----	463
<i>S. cerevisiae</i>	DAHSLRKANSTLGGFLFRAVSKEFHSSKDAESPDDLKMAAVGINRNARITANNVAGIV	596
<i>C. albicans</i>	RSSFRRSSNVGIS-----KSSEGP-----	453
	: * : . . : : * * * *	
<i>H. polymorpha</i>	----EDSSSTDEKRDAN-----	476
<i>S. cerevisiae</i>	NLNKEDLDSTTRRQKITEPKNFYNRHTSPQL	627
<i>C. albicans</i>	----DPTDSNIDLADIRE-----	467
	: . * . .	

Figura 11. A. Alineamientos locales con NirC de *E. coli* y Nar1.2 de *C. reinhardtii*. Los alineamientos se realizaron con el programa EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/). B. Alineamiento múltiple de Nar1 de *H. polymorpha* con proteínas de la familia FNT de levaduras. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). (*) Aminoácidos idénticos; (:) sustitución conservativa; (.) sustitución semiconservativa.

Todos los miembros de la familia FNT de bacterias tienen entre 256 y 285 residuos, siendo mayores los representantes en eucariotas, y presentan de 6 a 8 dominios transmembranales en conformación de α -hélice. Nar1 de *H. polymorpha* tiene 476 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 52,3 kDa. El perfil de hidrofobicidad de Nar1 de *H. polymorpha* determinado con los programas OCTOPUS (<http://octopus.cbr.su.se/index.php>) y ExPaSy-TMpred (http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form.html) predicen que está constituida por 6 dominios transmembranales en conformación α -hélice al igual que las proteínas FocA y NirC de *E. coli*, las proteínas NAR1 de *C. reinhardtii* e YHL008C de *S. cerevisiae* (Figura 12). En *H. polymorpha* las regiones amino y carboxilo terminal de Nar1 son citosólicas como en los transportadores FocA y NirC de *E. coli* y NAR1.1 en *C. reinhardtii*. Sin embargo, el extremo C-terminal de HpNar1 es más largo, característica que comparte con el transportador de *C. albicans* y de *S. cerevisiae*.

El punto isoeléctrico teórico calculado con los programas *Compute pI/Mw tool-ExpASY* (<http://www.expasy.org/>), *Gateway to Isoelectric Point Service* de EMBL (<http://www3.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl>) y ABIM (<http://sites.univ-provence.fr/~wabim/english/logligne.html>) fue de 6.06 con los dos primeros y de 6.43 con el tercero. La proteína NAR1 de *C. reinhardtii* es una proteína integral de la membrana del cloroplasto, implicada en el transporte de nitrito hacia el estroma (Mariscal *et al.*, 2004). La localización celular de Nar1 de *H. polymorpha*, así como el de las proteínas con dominios FNT de *S. cerevisiae* y de *C. albicans*, se analizó con el programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Los resultados obtenidos predicen que está principalmente en el retículo endoplasmático, con una probabilidad del 55.6 % (34,8 % en *S. cerevisiae* y 43,5 % en *C. albicans*) y en un 33.3 % en la membrana plasmática (26,1 % en *S. cerevisiae* y 30,4 % en *C. albicans*).

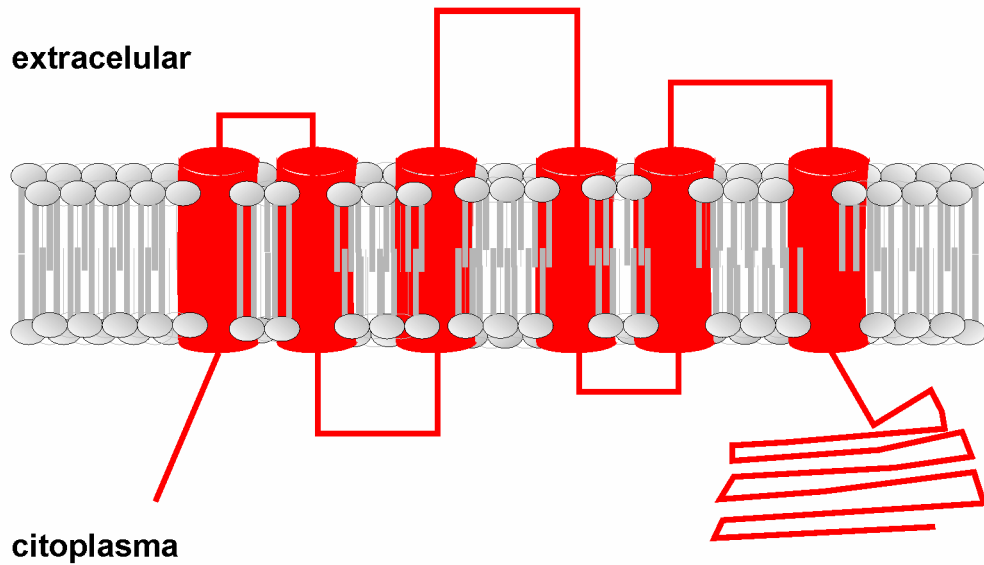


Figura 12. Predicción de la topología de *NarI* en la membrana plasmática. Ambos extremos están orientados hacia la cara citoplasmática siendo la región C-terminal un dominio largo formado por 214 de los 476 residuos que constituyen la proteína. El esquema es una adaptación del modelo obtenido con la aplicación informática TMRPres2D (<http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>).

1. 3. La cepa $\Delta narI$ presenta baja actividad nitrato reductasa (NR).

Una vez identificado que el producto del gen *HpNAR1* comparte similitud de secuencia con transportadores de nitrito y, más específicamente, con transportadores de nitrito de la familia FNT, decidimos estudiar si estaba implicado en el transporte de nitrito en *H. polymorpha*. Como primera aproximación determinamos la actividad NR y la tasa de excreción de nitrito, ya que actúan como indicadores de posibles modificaciones en el metabolismo del nitrato. Ambas determinaciones se llevaron a cabo en la cepa mutante, $\Delta narI$, y en la cepa portadora de varias copias del gen *HpNAR1*, *nNAR1* obteniendo que ambas cepas tienen menor actividad nitrato reductasa respecto de la actividad de la cepa silvestre (Figura 13).

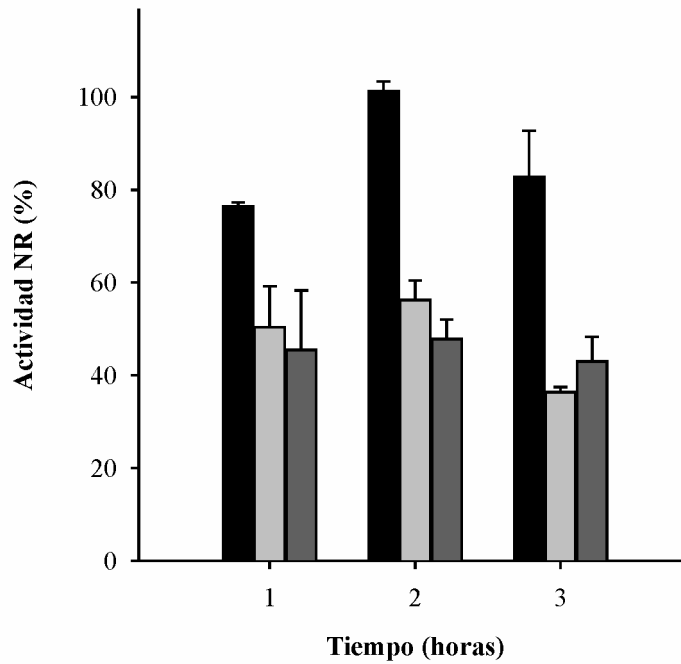


Figura 13. Las cepas $\Delta narI$ y $nNARI$ presentan baja actividad nitrato reductasa. Las células crecidas en YGNH hasta 10 mg/ml, se recogieron y se lavaron con agua MilliQ fría. A continuación se resuspendieron en medio YG con 5 mM de nitrato. La actividad NR se determinó en 50 mg de células a los tiempos indicados. Los valores de la actividad NR a las 3 h fueron 18.7 ± 4.4 nmoles de nitrito·mg células⁻¹·(min)⁻¹ en la cepa silvestre (barra negra); 8.2 ± 1.2 nmoles de nitrito·mg células⁻¹·(min)⁻¹ en la cepa $\Delta narI$ (barra gris claro) y 9.7 ± 2 nmoles de nitrito·mg células⁻¹·(min)⁻¹ en la cepa $nNARI$ (barra gris oscuro). Se representa la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

La menor actividad nitrato reductasa de $\Delta narI$ se correlaciona con la baja tasa de excreción de nitrito (Figura 14 B), independientemente de la concentración de nitrato usada (Figura 14 A). Sin embargo, a diferencia de $\Delta narI$, la cepa $nNARI$ presenta una tasa de excreción de nitrito siempre superior a la de la cepa silvestre (Figura 14 A y B). La notable disminución de la actividad NR en $nNARI$ podría ser el resultado de la inactivación que experimenta esta enzima cuando las concentraciones de nitrito extracelulares son elevadas (González *et al.*, 1994; Brito *et al.*, 1996).

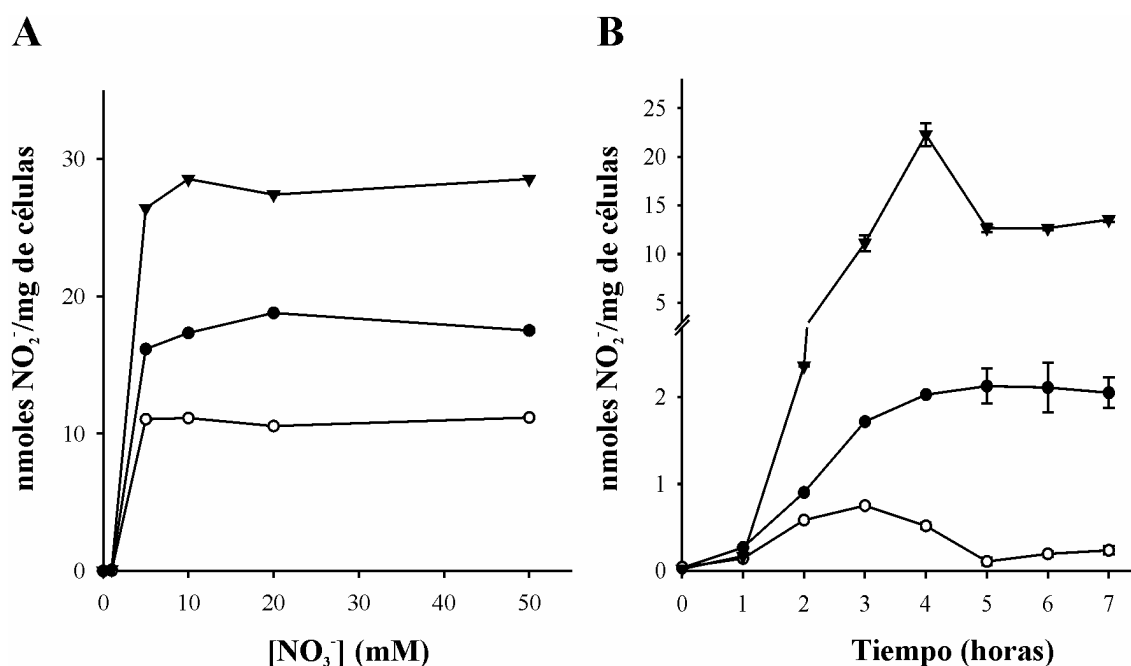


Figura 14. La excreción de nitrito disminuye en $\Delta nar1$. **A. Dependencia de la excreción de nitrito con la concentración de nitrato.** Las células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se lavaron y se resuspendieron en YG suplementado 0, 1, 5, 10, 20 y 50 mM de nitrato. Los datos corresponden a las 3 horas de inducción de un experimento representativo. **B. Cinética de excreción de nitrito.** El proceso de crecimiento e inducción es igual al descrito en el apartado A pero suplementando el medio con 5 mM de nitrato. El nitrito fue determinado en la cepa silvestre (●), $\Delta nar1$ (○) y $nNAR1$ (▼). Se representa el valor medio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

La menor actividad NR de la cepa mutante y $nNAR1$, así como los diferentes patrones de excreción de nitrito de estas cepas, indica la existencia de una relación entre Nar1 y la vía de asimilación de nitrato, sugiriendo que Nar1 podría actuar como una proteína implicada en la excreción de nitrito.

1. 4. La cepa $\Delta nar1$ presenta alteraciones en el consumo de nitrato y nitrito.

Con el fin de determinar si Nar1 está implicada en el transporte de nitrato o nitrito, se realizaron ensayos de consumo de estos aniones en diferentes condiciones experimentales. Tras el ayuno de nitrógeno, el consumo de nitrato y nitrito en las cepas silvestre, $\Delta nar1$ y $nNAR1$ son similares en su etapa inicial, sin embargo, $\Delta nar1$ ralentiza el consumo de nitrato a partir de los 120 min (Figura 15A), y de nitrito a partir de los 90 min (Figura 15 B). A diferencia de $\Delta nar1$, la cepa $nNAR1$ consume el nitrato con mayor velocidad que la cepa silvestre, ya

que a los 120 min ha consumido el 95 % del nitrato mientras que el silvestre ha consumido aproximadamente el 55 %. Sin embargo, el consumo de nitrito en *nNARI* es menor que en la cepa silvestre. En la cepa *nNARI* el consumo de nitrito disminuye a partir de los 60 min (Figura 15 B), conservando una asimilación más lenta respecto del silvestre. Esta menor tasa de consumo por parte de *nNARI* se sigue observando a los 180 min, donde ha consumido sólo el 85 % del nitrito adicionado al medio, mientras que la cepa silvestre prácticamente ha finalizado.

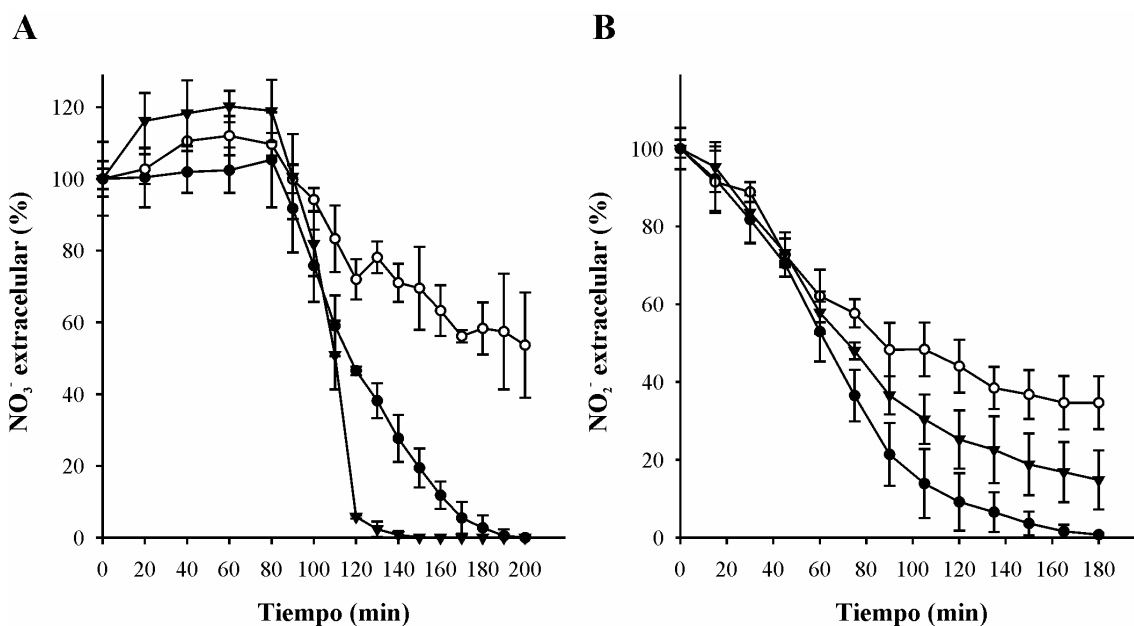


Figura 15. *ΔnarI* presenta menor consumo de nitrato y nitrito. Las células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml fueron ayunadas de nitrógeno en YG tamponado a pH 5.5 (MES-Tris 25 mM) durante 90 min. Los ensayos de consumo de nitrato (A) o de nitrito (B) se iniciaron con 1 mM o 0.5 mM respectivamente. La disminución de nitrato o nitrito extracelular fue determinada en la cepa silvestre (●), *ΔnarI* (○) y *nNARI* (▼). Los datos están expresados como el porcentaje del nitrato o del nitrito consumido ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Para saber si el transporte de nitrato o nitrito también está alterado en *ΔnarI* y en *nNARI* se determinó el transporte después de incubar las células en nitrato. Los resultados muestran que el transporte de 100 μ M de nitrato es ligeramente más lento en la cepa *ΔnarI* respecto de las cepas silvestre y *nNARI* (Figura 16 A). Sin embargo el transporte de 200 μ M de nitrito resultó ser igual en

la cepa silvestre y $\Delta nar1$ (Figura 16 B). Por tanto, la inducción previa en nitrato modifica levemente el perfil de transporte de nitrato en $\Delta nar1$.

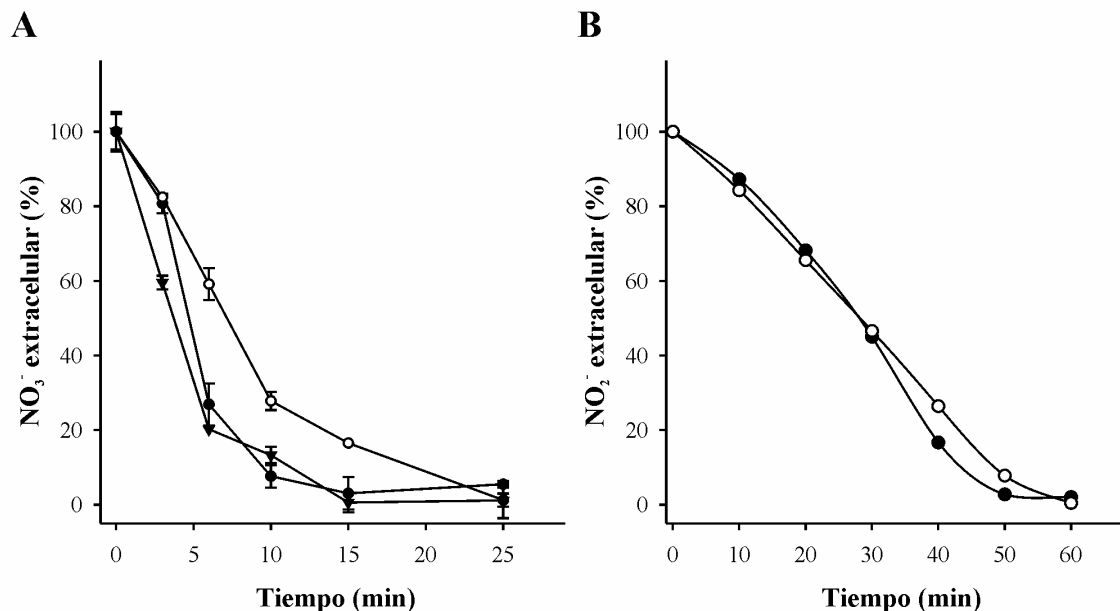


Figura 16. Transporte de nitrato y nitrito. A. Transporte de nitrato. Las células crecidas en medio YGNH hasta 10 mg/ml, se lavaron y se resuspendieron en medio YG suplementado con 5 mM de nitrato durante 2 horas. Tras la inducción las células se resuspendieron en medio YG tamponado a pH 5,5 (25 mM MES-TRIS). El consumo se inició al adicionar 100 μ M de nitrato. Los datos están expresados como el porcentaje del nitrato consumido \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. **B. Transporte de nitrito.** Las células crecidas hasta 10 mg/ml en medio YGNH fueron inducidas en medio YG suplementado con 2 mM de nitrato durante 2 horas. A continuación se resuspendieron 5 mg/ml de células en medio YG y se adicionó al medio 200 μ M de nitrito. Los resultados, expresados como el porcentaje de nitrito consumido, corresponden a un experimento representativo de los dos ensayos realizados. Las cepas analizadas fueron la cepa silvestre (●), $\Delta nar1$ (○) y *nNAR1* (▼).

El transporte de nitrato en las cepas WT, $\Delta nar1$ y *nNAR1* bajo las condiciones hasta el momento utilizadas tiene lugar a través del transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad Ytn1 y de un segundo sistema de transporte de nitrito, cuya expresión depende del factor transcripcional Yna1 (Machín *et al.*, 2004) necesario en la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato (Ávila *et al.*, 1998). Por tanto, con el objetivo de conocer si *Nar1* está implicado en el transporte de nitrito hacia el interior celular se usó la cepa $\Delta ynt1\Delta nar1$. Las células se indujeron en 2 mM de nitrato durante 2 h y se inició el transporte con 200 μ M de nitrito. Como se observa en la Figura 17 tanto $\Delta ynt1$ como $\Delta ynt1\Delta nar1$ transportan nitrito sin mostrar diferencias entre las cepas. Por tanto,

el transporte de nitrito en $\Delta ynt1\Delta nar1$ tiene lugar a través del sistema de transporte de nitrito de alta afinidad e independiente de Ynt1 y de Nar1. Por otra parte estos resultados indican que Nar1 no parece estar implicado en el transporte de nitrito hacia el interior celular en *H. polymorpha*.

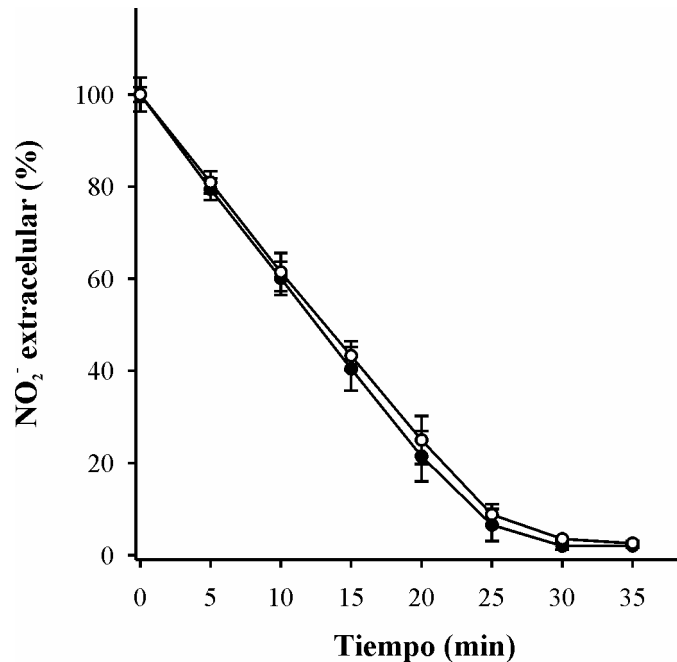


Figura 17. La cepa $\Delta ynt1\Delta nar1$ transporta nitrito. Las células crecidas hasta 10 mg/ml en medio YGNH fueron lavadas e inducidas en medio YG con 2 mM de nitrato durante 2 horas. En el consumo de nitrito se usaron 5 mg/ml de células resuspendidas en medio YG al que se adicionó 200 μ M de nitrito. El transporte de nitrito se determinó en las cepas $\Delta ynt1$ (●) e $\Delta ynt1\Delta nar1$ (○). Los datos están expresados como el porcentaje del nitrito transportado \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Por otra parte, en las células ayunadas de nitrógeno o incubadas previamente en nitrito, no sólo tiene lugar la entrada de nitrito sino que además la cepa $\Delta ynt1\Delta nar1$ asimila más nitrito que $\Delta ynt1$ (Figura 18). Estos resultados revelan la existencia de un sistema específico de nitrito que es independiente de la inducción por nitrato, ya que el ayuno de nitrógeno previo a la adición de nitrito no impide que sea asimilado. Por tanto existe un transportador de nitrito que está activo en condiciones de ayuno de nitrógeno independiente de Ynt1 y del transportador de alta afinidad de nitrito inducible por nitrato (Machín *et al.*, 2004). Además, al comparar el consumo de nitrito en $\Delta ynt1$, o en $\Delta ynt1\Delta nar1$, en condiciones de inducción previa en nitrito con el ayuno de nitrógeno, se observa

que ambas cepas consumen antes si han sido previamente expuestas al nitrito. Por tanto, el sistema específico de nitrito parece inducirse por nitrito.

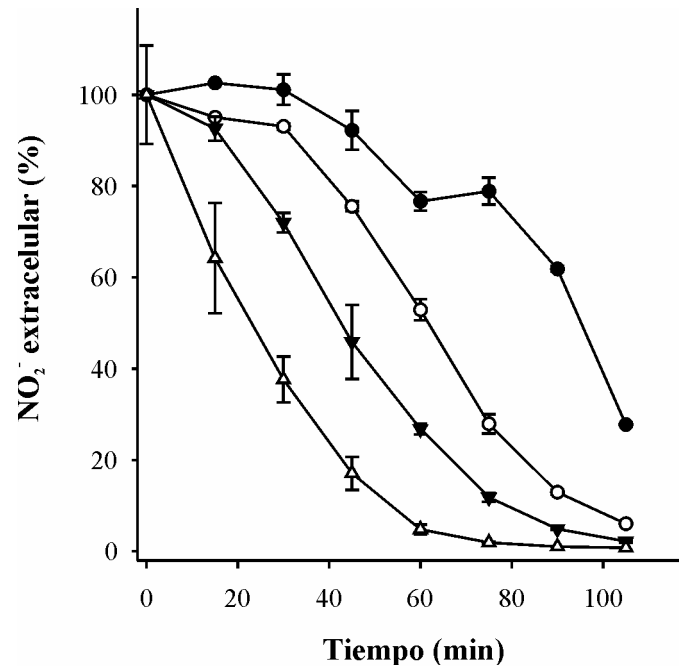


Figura 18. Consumo de nitrito de $\Delta ynt1$ e $\Delta ynt1\Delta nar1$. Las células crecidas en medio YGNH hasta 10 mg/ml fueron sometidas a ayuno de nitrógeno durante 90 min en medio YG tamponado a pH 5.5 (25 mM de MES-Tris) o bien se indujeron en medio YG con 0.5 mM de nitrito durante 2 horas. Finalizada la inducción, se lavaron y se resuspendieron en medio YG tamponado a pH 5.5 (25 mM de MES-Tris). En ambos casos el consumo se inició al añadir 0.5 mM de nitrito. La disminución de nitrito extracelular fue determinada en $\Delta ynt1$ (ayuno: ●; inducción: ▼) y en $\Delta ynt1\Delta nar1$ (ayuno: ○; inducción: △). Los datos están expresados como el porcentaje del nitrito consumido \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

El consumo de nitrito también está anticipado en el doble mutante $\Delta ynr1\Delta nar1$. Así en condiciones previas de ayuno de nitrógeno se observa que tanto la cepa $\Delta ynr1$ como $\Delta ynr1\Delta nar1$ consumen nitrito. La entrada de nitrito en estas cepas tiene lugar a través de Ynt1, ya que las trazas de nitrato presentes en el medio de ayuno de nitrógeno ejercen un efecto inductor sobre *YNT1*, y del sistema específico de nitrito de alta afinidad (Navarro *et al.*, 2008). La ausencia de Nar1 en el fondo genético $\Delta ynr1$ hace que el consumo de nitrito tenga lugar en los primeros 30 min, mientras que $\Delta ynr1$ sólo ha consumido el 64% del nitrito añadido al medio (Figura 19). Por tanto, la mutación en *HpNAR1* en el fondo $\Delta ynr1$ hace que la tasa de consumo de nitrito sea mayor. Una posible explicación de este comportamiento es que el nitrito consumido en $\Delta ynr1$ es el resultado del

nitrito transportado al interior, por Ynt1 y por el sistema de alta afinidad de nitrito independiente de Ynt1, más el nitrito que es excretado al medio extracelular a través de Nar1. A diferencia de la hipótesis inicialmente planteada en la que se consideró que Nar1 podría ser un transportador implicado en la entrada de nitrito, los resultados sugieren que Nar1 está implicada en la excreción de nitrito y no sabemos si también en la excreción de nitrato.

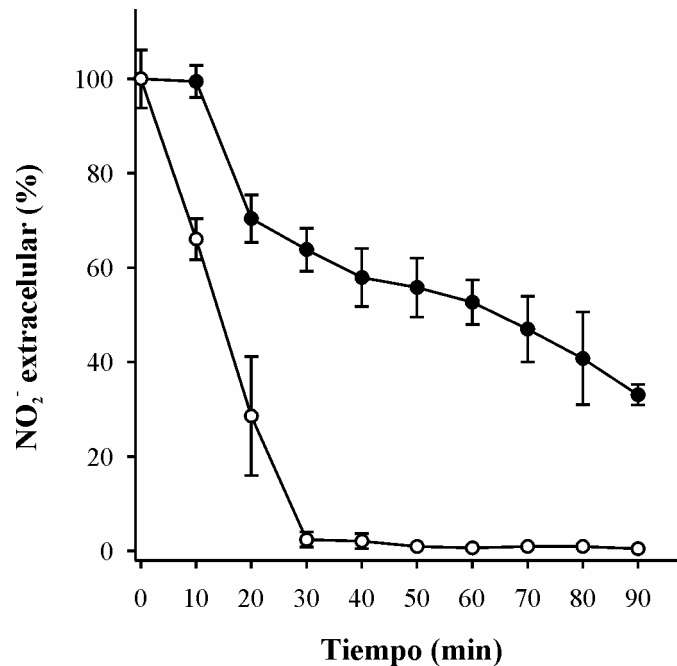


Figura 19. El consumo de nitrito es mayor en $\Delta ynr1\Delta nar1$. Las células crecidas en YGNH hasta alcanzar 10 mg/ml, se lavaron y se ayunaron durante 90 min en medio YG tamponado a pH 5.5 (25 mM MES-Tris). Una vez finalizado el ayuno se adicionó nitrito a una concentración final de 0.5 mM y determinando el consumo a los tiempos indicados en las cepas $\Delta ynr1$ (●) e $\Delta ynr1\Delta nar1$ (○). Los datos están expresados como el porcentaje del nitrito consumido \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

1. 5. $\Delta nar1$ acumula nitrito.

Una de las características de *H. polymorpha* es la excreción del nitrito obtenido a partir de la reducción del nitrato cuando éste se usa como fuente de nitrógeno. Por tanto, parte del nitrito que está dentro de la célula se reduce a amonio, por la acción de la nitrito reductasa, y parte se excreta al medio extracelular. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el sistema por el que el nitrito intracelular es excretado al medio de cultivo. Basándonos en los

resultados de consumo de nitrito (Figura 15 B), cabe preguntarse si Nar1 interviene en la salida de nitrito hacia el medio extracelular. Por tanto, si el nitrito sale a través de Nar1 su acumulación será elevada en la cepa $\Delta nar1$ mientras que en $nNAR1$ no habría acumulación. Para determinar si realmente Nar1 participa en la salida de nitrito se cuantificó su contenido intracelular en las cepas silvestre, $\Delta nar1$ y $nNAR1$ tras la adición de 1 mM de nitrito. Los resultados muestran que $\Delta nar1$ acumula más nitrito que la cepa silvestre, mientras que no hay acumulación en la cepa $nNAR1$ (Figura 20), indicando en efecto que Nar1 participa en la salida de nitrito.

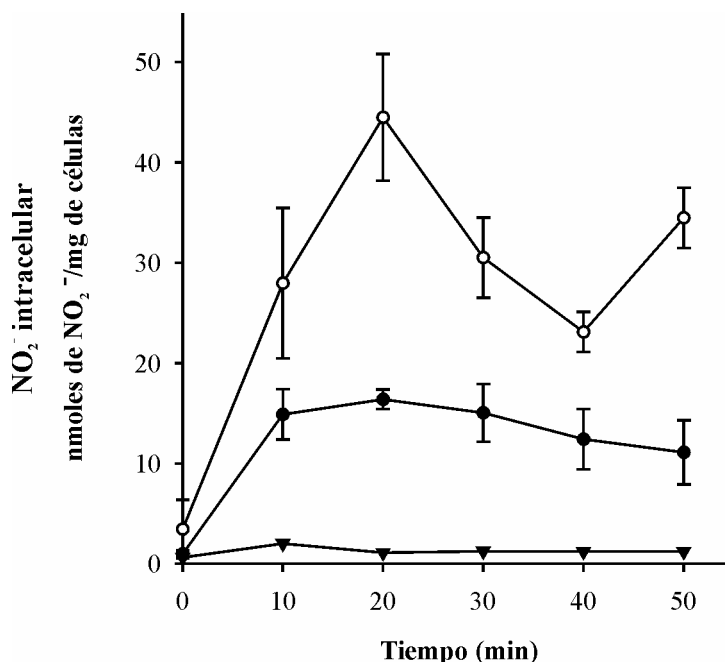


Figura 20. Acumulación de nitrito intracelular. Las células se crecieron en amonio hasta 10 mg/ml, se lavaron y se mantuvieron en ayuno de nitrógeno durante 120 min. A continuación se adicionó 1 mM de nitrito al medio de cultivo y se determinó el nitrito intracelular en las cepas silvestre (●), $\Delta nar1$ (○) y $nNAR1$ (▼). Se representa el valor medio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Una vez mostrada la participación de Nar1 en la excreción de nitrito realizamos ensayos de acumulación de nitrito en condiciones en las que las células fueran incapaces de reducir el nitrito a amonio, con el fin de potenciar aún más su acumulación. Para ello usamos la cepa $\Delta yni1$, a partir de la cual obtuvimos el doble mutante $\Delta yni1\Delta nar1$.

Como hemos mencionado anteriormente, *H. polymorpha* excreta nitrito en presencia de nitrato aún cuando *HpNAR1* está deletado (Figura 14), por lo que existe al menos otro sistema más, independiente de Nar1, por el que el nitrito es excretado. Sin embargo, desconocemos tanto la identidad molecular de dicho sistema como las condiciones bajo las cuales interviene en la salida de nitrito. Por ello realizamos dos tipos de ensayos: i) induciendo las células en nitrato previamente a la adición de nitrito, y ii) ayunando las células previamente a la adición de nitrito.

Los resultados del primer grupo de experimentos muestran que tras de 60 min de inducción en 5 mM de nitrato, y posterior ayuno, la cepa $\Delta yni1\Delta nar1$ acumuló más nitrito que $\Delta yni1$ (Figura 21). Sin embargo, en ambas cepas dicha acumulación fue puntual, obteniendo un máximo de acumulación a los 10 min.

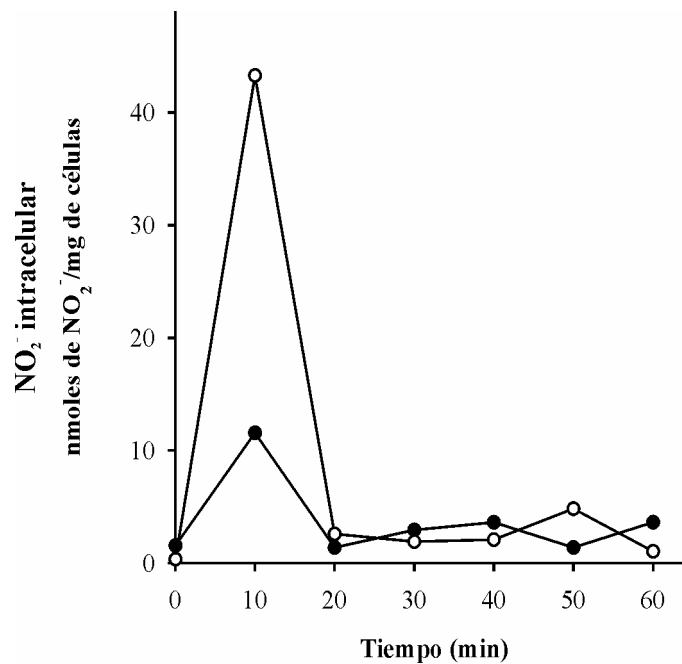


Figura 21. Acumulación de nitrito intracelular en $\Delta yni1$ y en $\Delta yni1\Delta nar1$. Las células crecidas hasta 10 mg/ml en presencia de amonio fueron lavadas e incubadas en 5 mM de nitrato durante 60 min. A continuación se lavaron y se resuspendieron en YG durante 60 min. Finalmente se adicionó al medio 1 mM de nitrito y se determinó el nitrito intracelular en las cepas $\Delta yni1$ (●) e $\Delta yni1\Delta nar1$ (○). Los experimentos, de los cuales se representa uno, se repitieron 3 veces.

Los resultados obtenidos a partir del segundo grupo de ensayos, es decir, sin la inducción previa en nitrato, muestran que la cepa $\Delta yni1\Delta nar1$ acumula nuevamente más nitrito al adicionar 1 mM de nitrito. En estas condiciones la acumulación máxima tiene lugar a los 20 min, disminuyendo paulatinamente a partir de dicho instante (Figura 22). Además, en estas condiciones los valores absolutos muestran que la delección de *HpYNI1* potencia la acumulación de nitrito si se combina con la delección de *HpNAR1*.

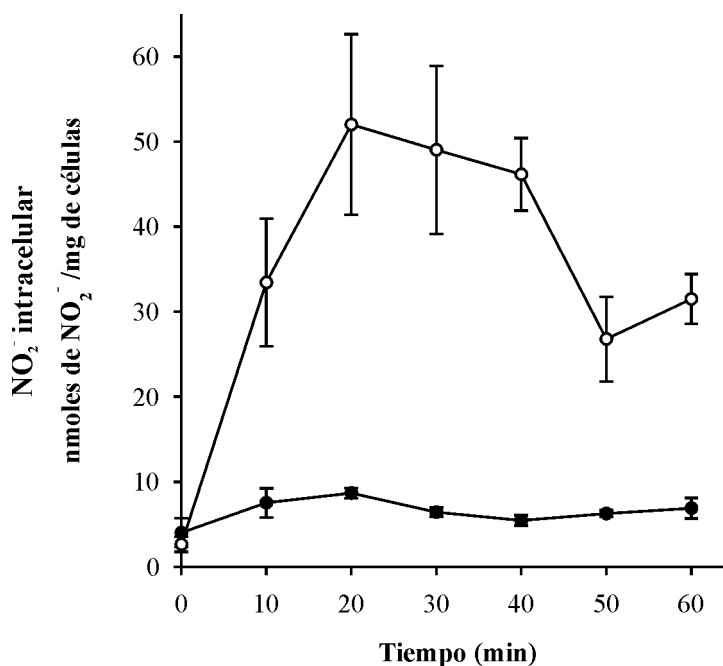


Figura 22. Nitrito intracelular en $\Delta yni1$ e $\Delta yni1\Delta nar1$. Las células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml fueron lavadas y resuspendidas en YG manteniéndolas en agitación durante 120 min. Finalmente se adicionó nitrito a una concentración final de 1 mM. La concentración intracelular de nitrito se determinó en las cepas $\Delta yni1$ (●) e $\Delta yni1\Delta nar1$ (○). Se representa el valor medio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Estos resultados indican nuevamente que Nar1 media la salida de nitrito y que el sistema de salida de nitrito independiente de Nar1 actúa cuando las células han sido previamente incubadas en nitrato. En esta última condición el descenso en los niveles intracelulares de nitrito en $\Delta yni1\Delta nar1$ es más rápido y tiene lugar en un intervalo de tiempo corto si lo comparamos con el obtenido cuando las células no se han preincubado en nitrato. Por tanto, este sistema independiente de Nar1 podría inducirse/activarse en presencia de nitrato, aunque no podemos descartar que también lo haga por el nitrito obtenido a partir de la

reducción del nitrato. Por otra parte, la cepa $\Delta yni1$, incubada previamente en nitrato, sólo acumula nitrito durante los primeros 10 min (Figura 21), ya que el anión sale de la célula a través de Nar1 y del sistema de salida de nitrito independiente de Nar1. La cepa $\Delta yni1$ también acumula nitrito cuando éste se añade al medio de cultivo, permaneciendo prácticamente constante en el tiempo (Figura 22). Estos resultados indican que Nar1 evita la acumulación intracelular de nitrito cuando las células están en presencia de nitrato y/o nitrito, mientras que el sistema de salida independiente de Nar1 parece actuar principalmente si las células se han incubado en nitrato.

Con el fin de conocer si Nar1 actúa desde el momento en el que se adiciona nitrato, se determinó la acumulación de nitrito en $\Delta yni1$ e $\Delta yni1\Delta nar1$ en presencia de 5 mM de nitrato. La cepa $\Delta yni1\Delta nar1$ acumula progresivamente el nitrito, mientras que en $\Delta yni1$ el nitrito intracelular disminuye tras alcanzar el máximo a los 10 min (Figura 23 A). Este comportamiento nos lleva a pensar que posiblemente Nar1 esté siempre presente en la célula, independientemente de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, mientras que el sistema de salida de nitrito independiente de Nar1 excreta nitrito si previamente las células han sido inducidas en nitrato (Figura 23 B). Una posible explicación de esta mayor excreción de nitrito es que la mayor acumulación intracelular de nitrito en $\Delta yni1\Delta nar1$ provoca que la excreción a través del sistema independiente de Nar1 se incremente. Además, este sistema saca el nitrito hacia el medio de cultivo desde los primeros 10 minutos de incubación en nitrato, lo que indica que está presente incluso cuando las células han sido sometidas a ayuno previo de nitrógeno. No obstante, no podemos descartar que dicho sistema se induzca durante el periodo de ayuno por las trazas de nitrato (o nitrito) presentes en el medio.

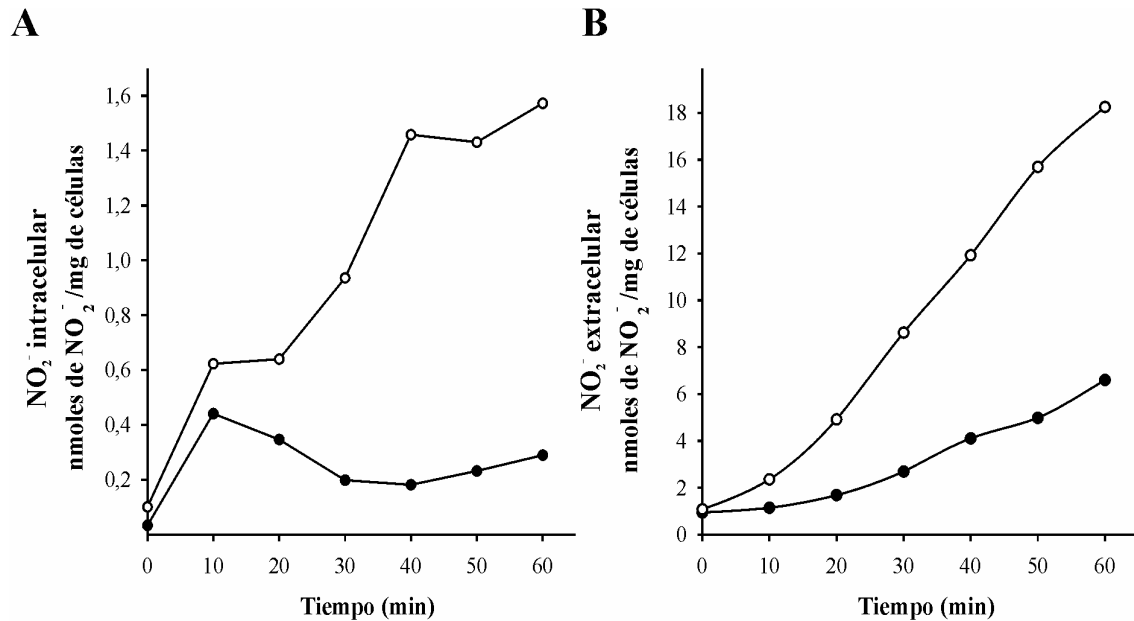


Figura 23. Acumulación y excreción de nitrito en $\Delta yni1$ e $\Delta yni1\Delta nar1$. Las células fueron crecidas en YGNH hasta 10 mg/ml de células. A continuación se lavaron y se incubaron en YG durante 120 min. Finalmente se adicionó al cultivo 5 mM de nitrato. La acumulación (A) y la excreción de nitrito (B) se determinaron en las cepas $\Delta yni1$ (●) e $\Delta yni1\Delta nar1$ (○). Se muestran experimentos representativos.

Como hemos visto, la adición de nitrato incrementa los niveles de nitrito intracelular (Figuras 21 y 23 A). La mayor acumulación observada en $\Delta yni1\Delta nar1$ podría explicarse si consideramos el efecto inductor del nitrato sobre los genes de la vía de asimilación de nitrato y más concretamente sobre *Ynt1p*, lo que favorece su transporte al interior de la célula (Figura 19). De esta forma, una vez que el nitrato está en el citoplasma se reduce a nitrito, acumulándose en mayor medida en $\Delta yni1\Delta nar1$. Para determinar si la inducción por nitrato es responsable de la mayor acumulación de nitrito en aquellas cepas que portan la interrupción de *Nar1*, determinamos su acumulación en $\Delta ynr1$ e $\Delta ynr1\Delta nar1$ al incubarlas en 1 mM de nitrito y en presencia o ausencia de 2 mM de nitrato. Los resultados muestran que la mayor acumulación de nitrito se obtiene al incubar $\Delta ynr1\Delta nar1$ en 1 mM de nitrito + 2 mM de nitrato (100 nmoles de nitrito/mg de células), siendo menor en 1 mM de nitrito (60 nmoles de nitrito/mg de células) (Figura 24). Por tanto, la presencia de nitrato favorece la acumulación intracelular de nitrito independientemente de la actividad NR.

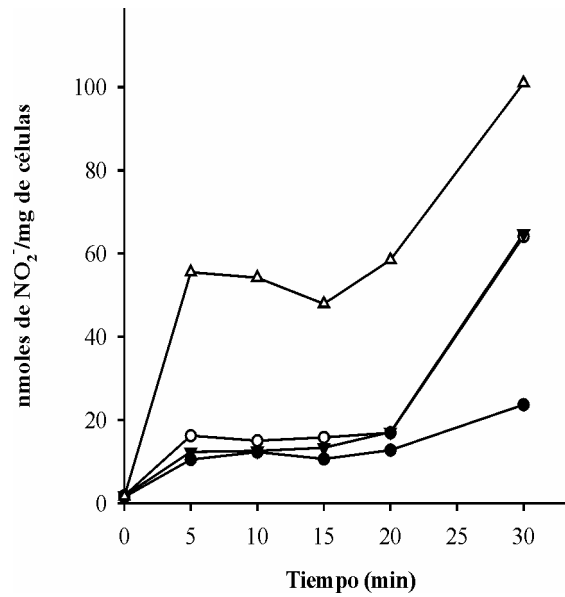


Figura 24. Acumulación de nitrito en $\Delta ynr1$ e $\Delta ynr1\Delta nar1$. Se siguió el mismo procedimiento que el descrito en la Figura 14, excepto que las células se incubaron en 1 mM de nitrito y en presencia (▼; △) o ausencia (●; ○) de 2 mM de nitrato. La concentración intracelular de nitrito se determinó en las cepas $\Delta ynr1$ (●; ▼) e $\Delta ynr1\Delta nar1$ (○; △). Se muestra un experimento representativo de 3 ensayos independientes.

Visto lo anterior decidimos determinar las máximas concentraciones de nitrito que puede acumular una cepa carente de los genes *HpNAR1* y en *HpYNII*. La cepa $\Delta ynr1\Delta nar1$ acumula más nitrito que $\Delta ynr1$, obteniendo el nivel máximo de nitrito intracelular a los 30 min tras la incubación en presencia de 1 mM de nitrito + 2 mM de nitrato (Figura 25). En estas condiciones también se obtiene la máxima acumulación de nitrito en $\Delta ynr1$ (Figura 25) y en $\Delta ynr1$ (Figura 24).

Como hemos mencionado anteriormente, los perfiles de acumulación de nitrito obtenidos al incubar las células en nitrato podrían deberse al efecto inductor que ejerce el nitrato sobre *YNTI*, así como sobre el sistema de nitrito de alta afinidad independiente de Ynt1 (Machín *et al.*, 2004), aumentando el flujo de entrada de ambas fuentes nitrogenadas en la célula. Este hecho también puede explicar la mayor acumulación de nitrito intracelular observada en $\Delta ynr1\Delta nar1$ al adicionar conjuntamente nitrato y nitrito.

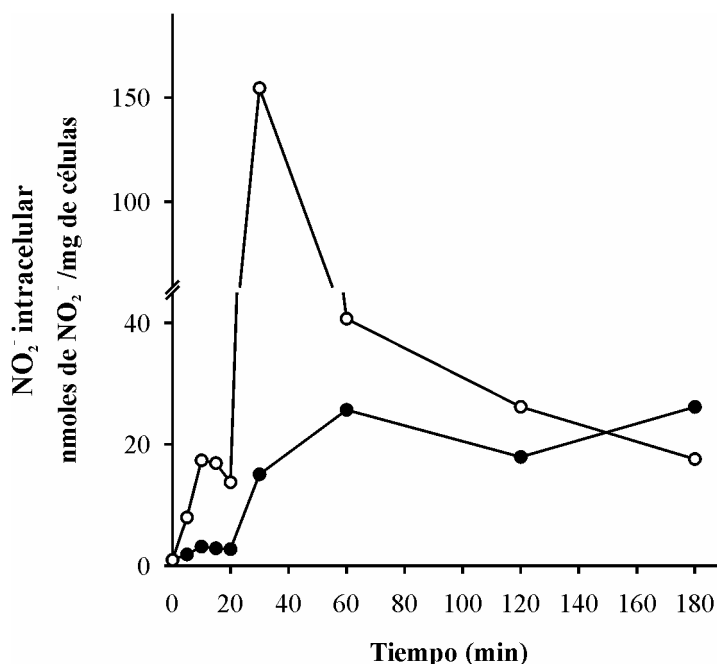


Figura 25. Acumulación de nitrito combinado con la adición de nitrato y nitrito. Las células se crecieron hasta 10 mg/ml, se lavaron y se incubaron en YG durante 120 min. A continuación se adicionó 1 mM de nitrito al medio + 2 mM de nitrato. El nivel de nitrito intracelular se determinó en $\Delta yni1$ (●) e $\Delta yni1\Delta nar1$ (○). Se muestra un experimento representativo.

En resumen, la levadura tiene como mínimo dos sistemas por los que el nitrito abandona la célula, siendo uno de ellos *Nar1*. Esta proteína parece estar presente en la célula de forma constitutiva, ya que su actividad no se incrementa por la presencia de nitrato, a diferencia del sistema de salida de nitrito independiente de *Nar1* que parece responder a la presencia de nitrato.

1. 6. $\Delta nar1$ presenta un reducido crecimiento en nitrito.

Dada la mayor acumulación de nitrito en las cepas que están afectadas en *HpNAR1*, decidimos caracterizar los posibles fenotipos de $\Delta nar1$ mediante goteos sobre medio sólido tamponados a diferentes pHs y con varias concentraciones de nitrato y nitrito. De todas las condiciones ensayadas tan sólo se obtuvieron diferencias entre la cepa silvestre y $\Delta nar1$ en medio sólido con nitrito tamponado a pH ácido, mientras que las diferencias en nitrato no fueron tan apreciables (Figura 26). Las impurezas del agar del medio sólido modifican sustancialmente ciertos fenotipos, por lo que usamos medios líquidos

suplementados con nitrato o nitrito con el fin de determinar el comportamiento de $\Delta nar1$ mediante curvas de crecimiento.

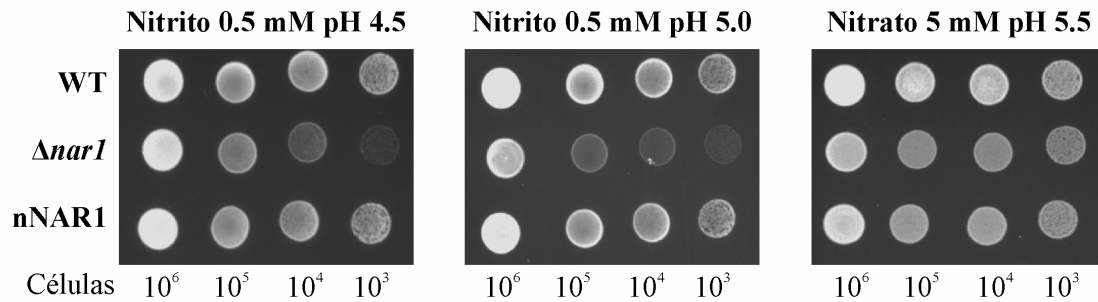


Figura 26. Crecimiento en medio sólido en presencia de nitrito y nitrato. Las cepas indicadas se crecieron en medio YPD durante la noche, se lavaron con agua MilliQ estéril y se gotearon diluciones seriadas sobre YG tamponado a pH 4.5 y 5 (50 mM ácido tartárico-TRIS) con 0.5 mM de nitrito o bien tamponado a pH 5.5 (50 mM MES-TRIS) con 5 mM de nitrato. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 días.

En medio líquido el crecimiento de $\Delta nar1$ en 5 mM de nitrato es ligeramente inferior al de la cepa silvestre (Figura 27 A). Sin embargo, en nitrito $\Delta nar1$ es incapaz de crecer incluso después de 48 h, a diferencia de la cepa nNAR1, que alcanza valores de densidad óptica próximos a la cepa silvestre (Figura 27 B). Por tanto, la delección de *HpNAR1* impide que la levadura crezca con normalidad en nitrito, mientras que su sobreexpresión afecta al crecimiento en nitrato.

También se analizó el crecimiento en 1 mM de nitrito de las cepas $\Delta ynt1$ e $\Delta ynt1\Delta nar1$, obteniendo que el crecimiento es ligeramente superior al de la cepa $\Delta ynt1$ (tabla 5). Estas diferencias de crecimiento apuntan a una mayor eficiencia en el transporte de nitrito en el doble mutante, de tal forma que todo el nitrito que entra en la célula se reduce a amonio. Por otra parte, estos resultados muestran que la ausencia de Ynt1 no impide que la levadura crezca en nitrito, sugiriendo nuevamente la existencia de un sistema de transporte específico que se induce en nitrito (Figuras 17 y 18).

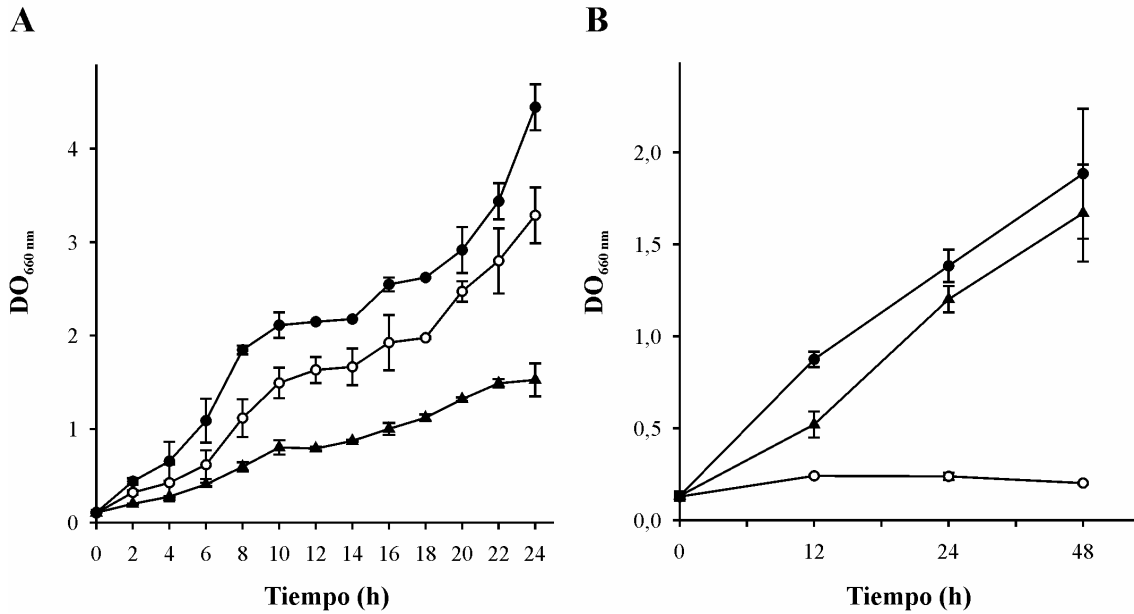


Figura 27. $\Delta nar1$ crece en nitrato pero es incapaz de crecer en nitrito. Las células fueron crecidas en YPD hasta saturación durante la noche. Posteriormente se lavaron 0.2 vol. del cultivo con agua estéril y se inocularon los medios de cultivo con 5 mM de nitrato (A) o 1 mM de nitrito (B) empleando una DO_{660} inicial de 0.15. El crecimiento se determinó en la cepa silvestre (●), $\Delta nar1$ (○) y $nNAR1$ (▲). Los valores corresponden al valor medio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes.

Condiciones de crecimiento	Densidad óptica (660 nm)			
	$\Delta ynt1$		$\Delta ynt1\Delta nar1$	
	10 h	24 h	10 h	24 h
pH 5,5	0,72 \pm 0,12	2,15 \pm 0,10	1,08 \pm 0,11	2,81 \pm 0,09
pH 6	0,64 \pm 0,11	1,67 \pm 0,13	0,89 \pm 0,05	2,18 \pm 0,08

Tabla 5. Crecimiento de $\Delta ynt1$ e $\Delta ynt1\Delta nar1$ en 1 mM de nitrito. Las células crecidas previamente en YPD, se inocularon en medios con 1 mM de nitrito a los pHs indicados (50 mM de MES-Tris). El medio fue inoculado con una DO_{660} inicial de 0.15. Los valores corresponden al valor medio \pm desviación estándar de dos ensayos independientes.

1. 7. Nar1 está implicado en la excreción de nitrato.

H. polymorpha transporta más nitrato del que es capaz de asimilar y el excedente de nitrato intracelular es excretado a través de la permeasa Ssu2, implicada en la excreción de sulfito (Cabrera, tesis doctoral, 2011). Dada la capacidad de Nar1 para excretar nitrito nos preguntamos si también era capaz de excretar nitrato. Un indicio que nos llevó a plantearnos esta posible actividad de Nar1 fue el hecho de que $\Delta nar1$ consume menos nitrato que el WT (Figura 15

A). Así, el nitrato intracelular, que va en aumento en el interior de la célula, impide que $\Delta nar1$ consuma más nitrato, lo que evitaría que el nitrito generado alcance concentraciones tóxicas en el citoplasma. Por tanto, es posible que Nar1 comparta junto con Ssu2 la función de excretar nitrato. Con el fin de validar esta hipótesis se realizó la determinación del nitrato intracelular en $\Delta nar1$ en combinación con la delección del gen *HpYNR1*, para evitar la reducción del nitrato, favoreciendo la acumulación intracelular de nitrato. La incubación de la cepa $\Delta ynr1\Delta nar1$ en 1 mM de nitrato provoca mayor acumulación de nitrato respecto de la obtenida en $\Delta ynr1$ (Figura 28). Este resultado indica que Nar1 está relacionada con el flujo de nitrato hacia el medio extracelular. Por lo tanto, *H. polymorpha* excreta nitrato a través de Ssu2 y también a través de Nar1.

La cuantificación del nitrato intracelular en las cepas $\Delta ynr1\Delta nar1$ e $\Delta ynr1\Delta ssu2$ revela las diferencias entre los niveles de nitrato acumulado por estos dobles mutantes. Así, una vez transcurridos 200 min de incubación en nitrato, la cepa $\Delta ynr1\Delta nar1$ acumula aproximadamente 4 veces más nitrato (97.5 nmoles de nitrato/mg de células) que $\Delta ynr1$ (20.5 nmoles de nitrato/mg de células), mientras que la cepa $\Delta ynr1\Delta ssu2$ acumula 1.5 veces más nitrato (32.5 nmoles de nitrato/mg células) que $\Delta ynr1$.

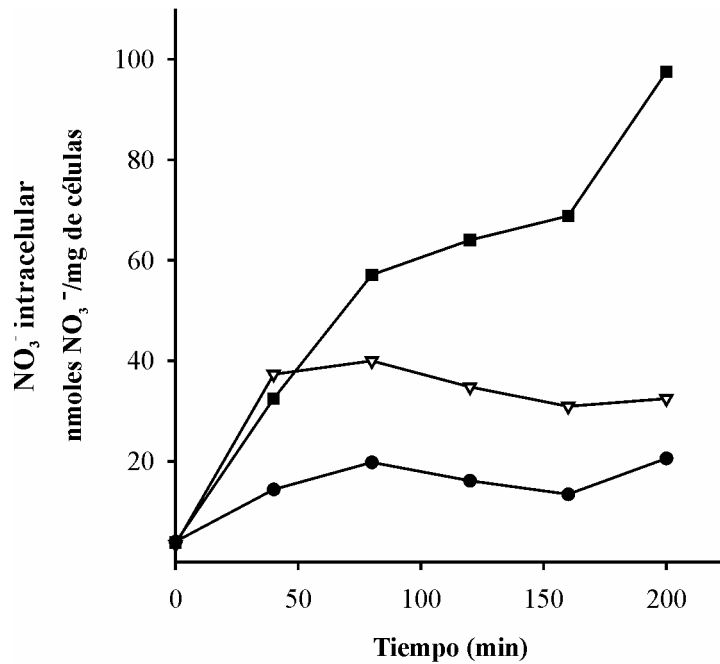


Figura 28. Acumulación intracelular de nitrato en $\Delta ynr1$ e $\Delta ynr1\Delta nar1$. Células crecidas en 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml y lavadas dos veces con agua MilliQ, se ayunaron de nitrógeno en medio YG durante 60 min. Al final del ayuno se adicionó al medio nitrato 1 mM. El nitrato intracelular se determinó en las cepas $\Delta ynr1$ (●), $\Delta ynr1\Delta nar1$ (■) e $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (▽). Se muestra un experimento representativo.

En resumen, aunque ambas permeasas están implicadas en el flujo de salida de nitrato parece que la capacidad de Nar1 de excretar nitrato es mayor a la de Ssu2.

Dado que Nar1 y Ssu2 actúan en la excreción de nitrato de la célula se determinó el contenido intracelular de nitrato combinando las deleciones en *HpNAR1* y *HpSSU2* en un fondo $\Delta ynr1$. Los resultados obtenidos muestran que el triple mutante acumula más nitrato, y que las concentraciones intracelulares obtenidas en esta cepa, a partir de los 80 min de incubación, se aproximan a la suma de las concentraciones que alcanza cada doble mutante por separado (Figura 29).

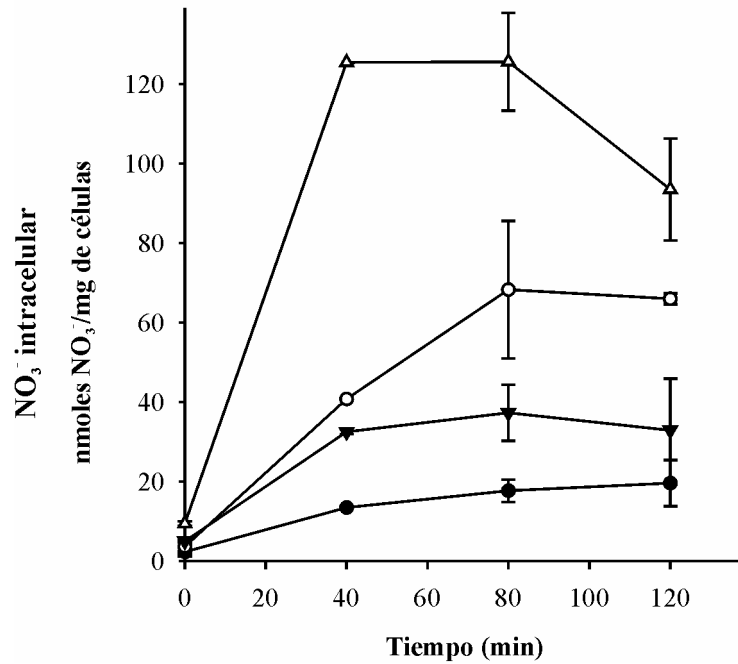


Figura 29. Acumulación de nitrato en $\Delta ynr1\Delta nar1\Delta ssu2$. Células crecidas en YGNH hasta 10 mg/ml, se lavaron dos veces con agua MilliQ y se resuspendieron en medio YG, manteniéndolas en ayuno de nitrógeno durante 60 min. Al final del ayuno se adicionó 1 mM de nitrato y se retiraron muestras a los tiempos indicados. La concentración intracelular de nitrato se determinó en $\Delta ynr1$ (●), $\Delta ynr1\Delta nar1$ (○), $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (▼) e $\Delta ynr1\Delta nar1\Delta ssu2$ (△). Se representa el valor medio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Hasta ahora hemos descrito que Nar1 y Ssu2 tienen funciones similares en cuanto al flujo de salida de nitrato, pero desconocemos si actúan de forma simultánea o secuencial. Para conocer las condiciones en las que operan estas proteínas determinamos el nitrato intracelular a intervalos de tiempo corto (hasta los 20 min, Figura 30 A) y largo (a partir de 80 min hasta los 200 min, Figura 30 B). Los resultados muestran que la acumulación de nitrato sigue siendo máxima en el triple mutante desde los 2 min de incubación hasta el final del experimento. En cuanto a los dobles mutantes se observa que la cepa $\Delta ynr1\Delta ssu2$ acumula más nitrato durante los primeros 20 minutos, mientras que $\Delta ynr1\Delta nar1$ se comporta de forma similar a la cepa $\Delta ynr1$ (Figura 30 A). Estos resultados indican que el nitrato es excretado inicialmente a través de Ssu2, y tras alcanzar aproximadamente 60 nmoles de nitrato/mg de células, lo hace a través de Nar1. Por tanto, a corto plazo, cuando hay bajos niveles de nitrato intracelular, es la proteína Ssu2 la responsable de excretar nitrato, ya que en $\Delta ynr1\Delta nar1$ no se

observa una acumulación apreciable. Por el contrario, $\Delta ynr1\Delta nar1\Delta ssu2$ acumula más nitrato que $\Delta ynr1\Delta ssu2$, indicando que la salida de nitrato a través de Nar1 se inicia cuando se alcanzan niveles del orden de 60 nmoles de nitrato/mg de células. Estos resultados sugieren que Ssu2 tiene mayor afinidad por el nitrato que Nar1. Esta conclusión también está apoyada por el hecho de que $\Delta ynr1\Delta nar1$ acumula nitrato al prolongar la incubación hasta los 80 min en 1 mM de nitrato. Además, que Nar1 muestre menor afinidad por el nitrato está de acuerdo con su pertenencia a la familia de transportadores de formiato/nitrito, siendo esta la primera vez que se describe que un transportador de esta familia excreta nitrito y nitrato.

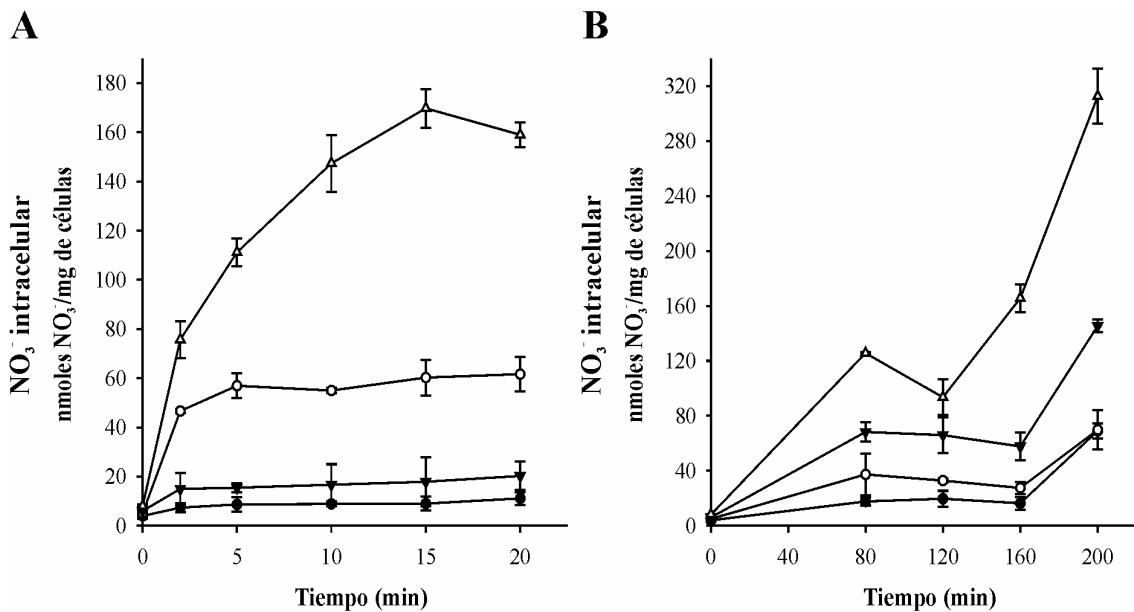


Figura 30. Acumulación intracelular de nitrato. Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se lavaron dos veces con agua MilliQ, y se resuspendieron en medio YG, manteniéndolas en ayuno de nitrógeno durante 60 min. Al final del ayuno se adicionó 1 mM de nitrato y se retiraron muestras en intervalos de tiempo corto (A) y a tiempos largos (B). La concentración intracelular de nitrato se determinó en $\Delta ynr1$ (●), $\Delta ynr1\Delta nar1$ (▼), $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (○) e $\Delta ynr1\Delta nar1\Delta ssu2$ (△). Se representa el valor medio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

1. 8. Nar1 protege de la toxicidad generada por el nitrito.

La adición de nitrato a los medios de cultivo de *H. polymorpha* implica la generación de nitrito siendo éste uno de los intermediarios tóxicos obtenidos

durante la reducción del nitrato. El nitrito es un compuesto tóxico para las células. Se ha descrito que la adición de nitrito a medios de cultivo de levaduras cuyo pH es ácido (pH = 5.0) da lugar a la formación del ácido nitroso (pKa = 3.3). El HNO₂ es permeable a la membrana plasmática y entra en la célula por difusión. Una vez en el interior, el pH neutro del citoplasma provoca su oxidación obteniendo NO₂⁻. Esta forma aniónica es impermeable a la membrana plasmática por lo que se acumula dentro de la célula reduciendo los niveles de ATP al inhibir la actividad de la gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa (Hinze y Holzer, 1985). En plantas se ha descrito que la principal vía de síntesis de óxido nítrico tiene lugar a partir del nitrito en una reacción catalizada por la nitrato reductasa (Klepper, 1987; Yamasaki *et al.*, 1999; Rockel *et al.*, 2002). La enzima nitrato reductasa que normalmente reduce el NO₃⁻ a NO₂⁻, también posee una actividad intrínseca a través de la cual, en condiciones en que el NO₂⁻ se acumula es capaz de reducirlo a óxido nítrico (NO). El óxido nítrico es un gas moderadamente soluble en agua que difunde rápidamente a través de las biomembranas. En *S. cerevisiae* el óxido nítrico induce rotura de las hebras de ADN (Sobol *et al.*, 2008). La reacción entre los radicales de óxido nítrico (\cdot NO) y superóxido (\cdot O₂⁻) dan lugar a la formación del peroxinitrito (ONOO⁻) que causa la oxidación de lípidos, inhibición de la síntesis de ADN así como fractura de sus cadenas por nitración y desaminación de bases (especialmente de guanina), nitración de residuos de aminoácidos aromáticos y la destrucción de restos tioles activos (-SH). La nitrosilación de tirosinas puede llevar asimismo a la inactivación enzimática por inhabilitación del sitio activo, del sitio de reconocimiento de sustrato o cofactor, o de ambos (Peuchen *et al.*, 1997; Navarro y Boveris, 2008; Dalle-Donne *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la adición de ONOO⁻ a cultivos de *S. cerevisiae* provoca inhibición del crecimiento como consecuencia del estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2011). Como hemos visto, uno de los mecanismos que tiene *H. polymorpha* para regular la concentración de nitrito intracelular es la excreción de nitrato y nitrito. Por tanto, el proceso de asimilación de nitrato implica que la generación de nitrito ha de permanecer en un rango de concentraciones inocuas para la célula. Basándonos

en los resultados de acumulación intracelular de nitrato y nitrito de la cepa $\Delta nar1$, y principalmente en su incapacidad para crecer en presencia de nitrito (Figura 27 B), cabe esperar que la ausencia de Nar1 modifique la homeostasis del nitrito y en consecuencia afecte a la viabilidad celular.

Como aproximación inicial observamos el estado de supervivencia de las células crecidas en 5 mM de nitrato tiñéndolas con azul de tripán, un colorante vital que tiñe a las células muertas, observando mayor proporción de células muertas en $\Delta nar1$ (Figura 31).

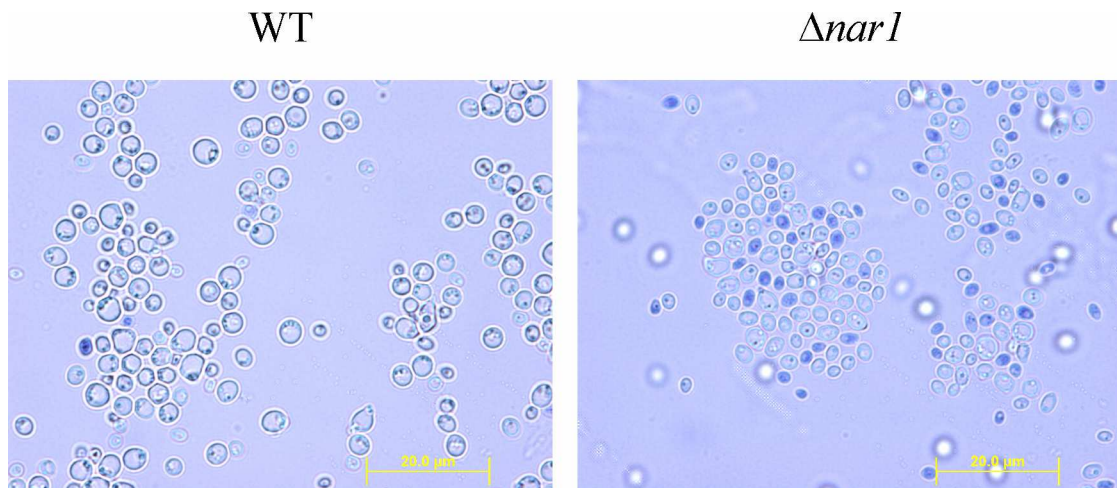


Figura 31. Tinción de las cepas silvestre y $\Delta nar1$. Las células, inoculadas a una densidad óptica inicial de 0.15 en medio YG con 5 mM de nitrato, se crecieron durante 72 horas alcanzando densidades ópticas de 13.4 en la cepa silvestre y 10.5 en $\Delta nar1$. A continuación se tiñeron con azul de tripán y se observaron en el microscopio óptico. Las células muertas tienen el citoplasma teñido de azul.

En base a estos resultados se llevó a cabo la cuantificación de la viabilidad celular al incubar la cepa silvestre, $\Delta nar1$, $nNAR1$, $\Delta ssu2$, $nSSU2$ y $\Delta nar1\Delta ssu2$ en nitrato y de la cepa silvestre, $\Delta nar1$ y $nNAR1$ en nitrito. En este contexto la viabilidad celular hace referencia a la capacidad que tienen las cepas estudiadas para sobrevivir a la incubación en nitrato o nitrito. La supervivencia se determinó mediante la capacidad de las levaduras para formar colonias en un medio rico.

Las incubaciones en nitrato reducen el número de células viables en todas las cepas analizadas (Figura 32 A y B). La incubación de las cepas silvestre, $\Delta nar1$ y $nNAR1$ en 10 mM de nitrato durante 4 h redujo la supervivencia en un 12 %, 48 % y 82 %, respectivamente. Tras 8 h de incubación la reducción de la viabilidad es similar entre las cepas silvestre (63 %) y $\Delta nar1$ (54 %) mientras que $nNAR1$ presenta de nuevo la viabilidad más reducida (92 %) (Figura 32 A). Las diferencias entre estas cepas radican en su capacidad para acumular o excretar nitrito. El hecho de que la viabilidad de la cepa $\Delta nar1$ sea similar a la de la cepa silvestre podría deberse al menor consumo de nitrato que tiene lugar en $\Delta nar1$ (Figura 15 A). La supervivencia de $\Delta nar1$ disminuye notablemente al combinarse con la delección en *HpSSU2*, que codifica un transportador implicado en la excreción de nitrato (Figura 32 B). La cepa $\Delta nar1\Delta ssu2$ tiene una tasa de excreción de nitrito ligeramente superior a la cepa silvestre (Figura 32 C). Esta mayor excreción de nitrito en $\Delta nar1$ se debe a la mayor acumulación de nitrato intracelular al carecer de *Ssu2*. De esta forma, la mayor acumulación de nitrato induce al sistema de excreción de nitrito independiente de *Nar1*, dando cuenta de la mayor tasa de excreción de nitrito si lo comparamos con la obtenida en $\Delta nar1$ (Figura 32 C). Por otra parte, $\Delta ssu2$ reduce su viabilidad en un 88 %, próximo a los valores obtenidos en $\Delta nar1\Delta ssu2$ (86 %) tras 8 h de incubación en nitrato (Figura 32 B). La cepa $\Delta ssu2$ se caracteriza por una alta tasa de excreción (Figura 32 C) y baja acumulación de nitrito, mientras que $\Delta nar1\Delta ssu2$ excreta menos nitrito y acumula más nitrato (nitrito) que $\Delta ssu2$. La diferencia entre la cepa silvestre y $nNAR1$ radica en el número de copias del gen *HpNAR1* que porta cada una y, por tanto, en la tasa de excreción de nitrito (Figura 14). La menor viabilidad de $nNAR1$ la podríamos atribuir al gasto continuo de poder reductor necesario en la síntesis de nitrito (que no se asimila), lo que ocasiona un consumo energético constante. Este hecho se correlaciona con la menor tasa de crecimiento de $nNAR1$ en 5 mM de nitrato (Figura 27 A) así como con la menor viabilidad de la cepa $\Delta ssu2$, cuya excreción de nitrito es similar a la de $nNAR1$. Por otra parte, la menor viabilidad de $nNAR1$

no está afectada por el nitrito intracelular, ya que en esta cepa su acumulación es prácticamente nula (Figura 20). La cepa *nSSU2* apenas presenta excreción de nitrito, y al igual que *nNAR1*, no lo acumula (Cabrera, tesis doctoral, 2011). La menor viabilidad de esta cepa en nitrato podría ser debida al gasto energético asociado al transporte y excreción de nitrato. Por tanto, la acumulación y excreción de nitrito (y/o nitrato) parecen ser los procesos responsables de la menor viabilidad en las diferentes cepas analizadas al ser incubadas en nitrato.

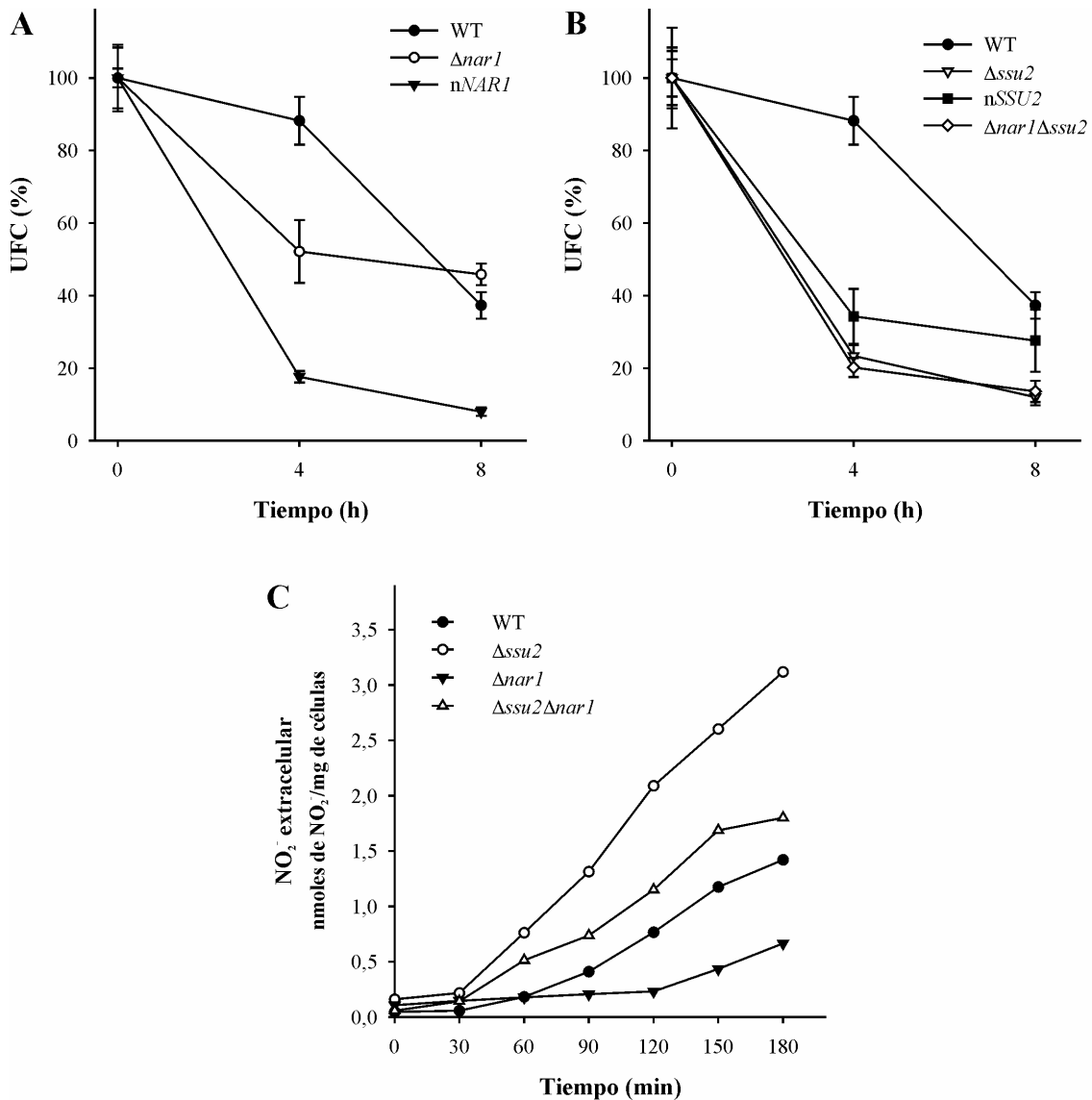


Figura 32. Viabilidad celular en nitrato. Las células crecidas en YGNH hasta 10 mg/ml, se lavaron con agua MilliQ estéril y se resuspendieron en YG suplementado con 10 mM de nitrato. A los tiempos indicados se retiraron muestras del medio de cultivo y se realizaron las diluciones para sembrar en medio rico. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 días. La viabilidad celular de la cepa silvestre, $\Delta nar1$, *nNAR1* (A), $\Delta ssu2$, *nSSU2* y $\Delta nar1 \Delta ssu2$ (B) se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC). Se representa el valor medio \pm

desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. **C. Excreción de nitrito.** Las células crecidas en YGNH hasta 10 mg/ml se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en YG suplementado con 1 mM de nitrato. A los tiempos indicados se determinó el nitrito excretado en las cepas silvestre (●), $\Delta nar1$ (▼), $\Delta ssu2$ (○) y $\Delta nar1\Delta ssu2$ (△). Se muestra un ensayo representativo.

Con el fin de determinar si es el nitrito del medio extracelular el causante de la reducción de la viabilidad celular se realizaron incubaciones en nitrito. Los resultados muestran que la viabilidad celular de $\Delta nar1$ es inferior en nitrito (Figura 33) lo que se correlaciona con los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en nitrito (Figura 27 B). La incubación de $\Delta nar1$ en 1 mM de nitrito afecta notablemente a la viabilidad celular, siendo del 30 % a las 4 horas y prácticamente nula al cabo de 8 horas. Esta reducida viabilidad de $\Delta nar1$ parece ser consecuencia de la acumulación intracelular del nitrito. La supervivencia de la cepa *nNAR1* también es reducida disminuyendo aproximadamente hasta el 60 % tras 8 horas de incubación (Figura 33). Así, tal y como hemos propuesto anteriormente, la supervivencia de *nNAR1* podría estar afectada por el costo energético que supone la excreción del nitrito transportado al interior.

En resumen, la viabilidad celular que muestra $\Delta nar1$ en nitrito podría derivarse de su acumulación intracelular, de tal forma que Nar1 es esencial para mantener la viabilidad de las células en presencia de nitrito, evitando su acumulación intracelular. Por otra parte, la menor viabilidad de *nNAR1* parece estar asociada con el gasto energético que supone el transporte continuado de nitrito hacia el medio extracelular.

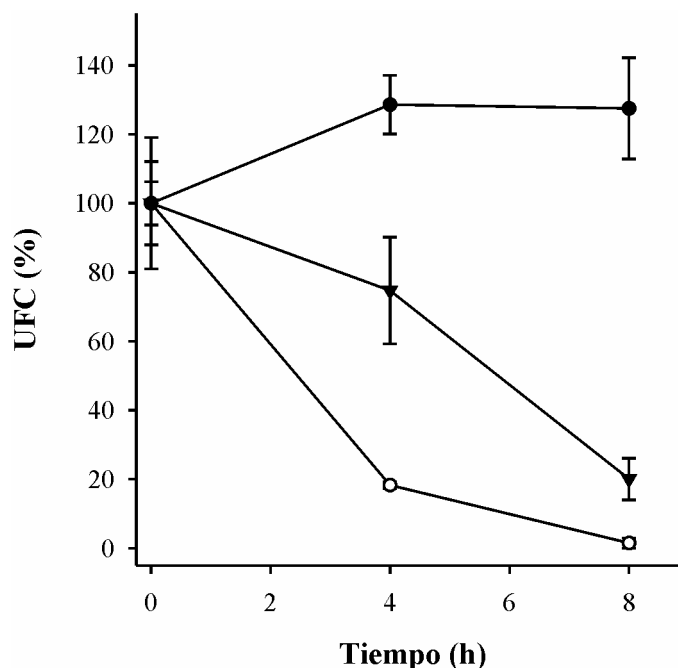


Figura 33. Viabilidad en nitrito. Células crecidas en YGNH hasta 10 mg/ml, se lavaron con agua MilliQ estéril y se incubaron en YG tamponado a pH 5.5 (MES-Tris 25 mM) suplementado con 1 mM de nitrito. A los tiempos indicados se retiraron muestras del medio de cultivo y se realizaron las diluciones para sembrar en medio rico. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 días. La supervivencia de la cepa silvestre (●), $\Delta narI$ (○) y *nNAR1* (▼) se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC). Se representa el valor medio \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

1.9. Expresión de *HpNAR1*.

Conocer el grado de expresión del gen *HpNAR1* nos permite saber si está sujeto a la inducción por nitrato y/o nitrito y si responde a la represión catabólica por nitrógeno como los genes de la vía de asimilación del nitrato. Para ello se cuantificó la expresión relativa del gen *HpNAR1* mediante PCR a tiempo real, siendo 6 veces superior en nitrato respecto de amonio (Figura 34).

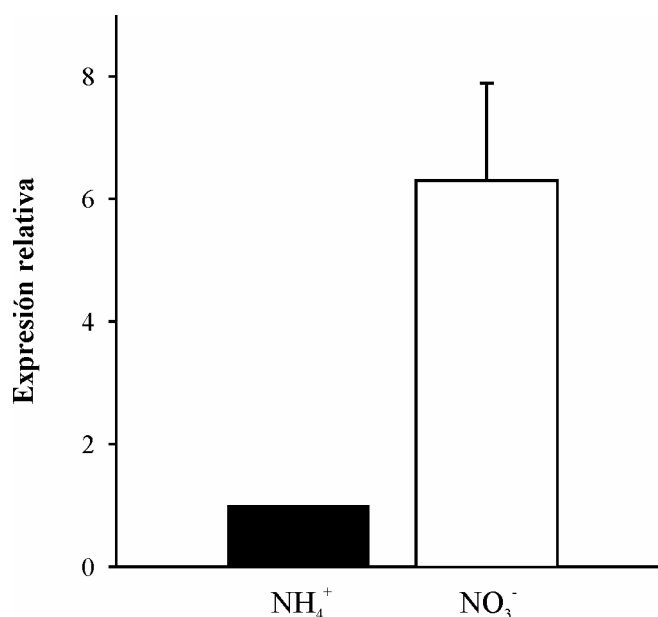


Figura 34. Expresión relativa de *HpNARI*. Células crecidas en medio con amonio hasta 10 mg/ml, se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en medio YG suplementado con 5 mM de amonio (columna negra) o nitrato (columna blanca). La expresión se determinó a partir de las células incubadas durante 2 horas. Se representa el valor medio \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

La expresión del gen *HpNARI* en nitrito a través de PCR a tiempo real no aportó datos consistentes por lo que se determinó la expresión del gen a través de la actividad β -galactosidasa. Para ello se colocaron en fase las secuencias del promotor de *HpNARI* y el gen reportero *lacZ*. Así, determinamos la expresión de la construcción *NARI-lacZ* en la cepa silvestre al incubar las células en nitrito 1 mM, amonio 5 mM y nitrato 5 mM. En nitrito la actividad β -galactosidasa descendió en los 60 min siguientes después de ser adicionado al medio (datos no mostrados). Pensamos que este descenso en la actividad es consecuencia de la propia adición de nitrito ya que la actividad β -galactosidasa fue nula al incubar la cepa silvestre o la cepa $\Delta yniI$, portadoras de *YNI1-lacZ*, en 1 mM de nitrito durante 150 min (datos no mostrados). Así, para verificar si era el nitrito el responsable del descenso en la actividad, analizamos la actividad de la cepa silvestre portadora de la fusión de *ENAI-lacZ*. Este gen codifica la principal Na⁺-ATPasa implicada en la salida de Na⁺/Li⁺. El Na⁺ y el Li⁺ son inductores de la expresión de *ENAI* ya que incrementan los niveles de este gen entre 10 y 13 veces (Rodríguez *et al.*, 2010). Por tanto, determinamos el nivel de expresión de *ENAI-lacZ* al inducir las células en 0,7 M de Na⁺ en presencia o ausencia de 1

mM de nitrito. La incubación en nitrito redujo los niveles de expresión de *ENAI* en un 96 %. Por otra parte la adición de 100 μ M de nitrito a la mezcla de reacción no modificó la actividad (Figura 35) por lo que la adición de nitrito al medio de cultivo disminuye la actividad β -galactosidasa *in vivo*.

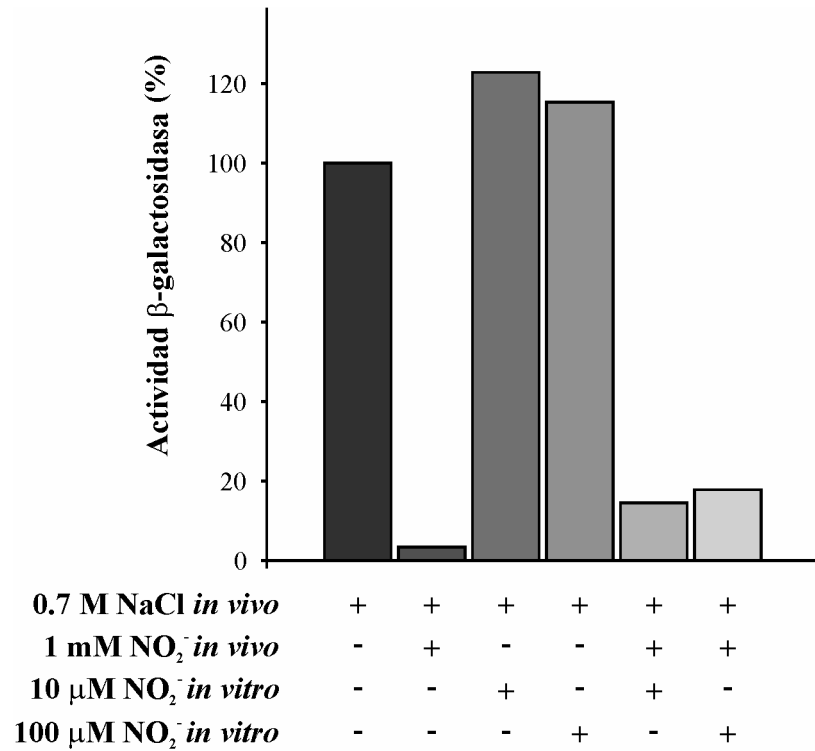


Figura 35. La actividad β -galactosidasa está negativamente afectada *in vivo* por nitrito. Las células crecidas en medio YGNH hasta 10 mg/ml se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en YG al que se le adicionó 0.7 M de NaCl y 1 mM de nitrito según se detalla en la figura. La actividad β -galactosidasa corresponde a células inducidas en los respectivos medios durante 2 horas de incubación y las concentraciones de 10 y 100 μ M de nitrito corresponden a la concentración final adicionada a la mezcla de reacción. Se muestra un experimento representativo.

Cuando analizamos la expresión de *HpNARI* en 5 mM de amonio y de nitrato observamos que apenas se modificó después de 7 horas de incubación. Sin embargo, la expresión en nitrato fue aproximadamente un 23 % superior respecto de la de amonio a partir de las 2 horas (Figura 36).

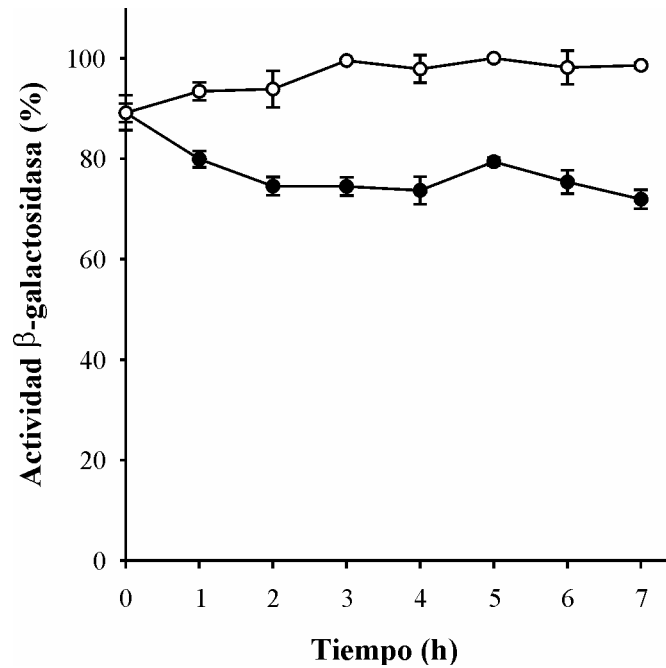


Figura 36. Expresión de *NAR1-lacZ*. La expresión fue seguida mediante la actividad β -galactosidasa en la cepa silvestre portadora de la fusión *NAR1-lacZ*. Las células se crecieron en YG suplementado con 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml. A continuación se lavaron y se resuspendieron en YG suplementado con 5 mM de amonio (●) o 5 mM de nitrato (○). Se representa el valor medio de la actividad β -galactosidasa \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Los resultados de expresión de *HpNAR1* obtenidos por RT-PCR y actividad β -galactosidasa fueron poco consistentes. Aún así, los niveles de expresión obtenidos en nitrato no alcanzan los observados por el gen *HpYNR1* (Rodríguez *et al.*, 2010). Por otra parte, *HpNAR1* se expresa en amonio a diferencia del resto de los genes de la vía de asimilación de nitrato (Brito *et al.*, 1999). La aparente expresión constitutiva de esta proteína podría estar relacionada con su papel en la excreción de nitrato y nitrito en esta levadura. Por ello, para incidir sobre este tema decidimos determinar los niveles de la proteína Nar1-HA en diferentes condiciones.

1.10. Regulación postraduccional de Nar1.

1.10.1. Niveles de Nar1 en diferentes fuentes nitrogenadas.

Como se ha expuesto anteriormente, la expresión de *HpNAR1* es ligeramente superior en nitrato respecto de la mostrada en amonio, y en ambos casos las incubaciones durante intervalos prolongados no modifican significativamente el nivel de expresión (Figura 36). Sin embargo, Nar1 podría estar sometida a algún tipo de regulación postraduccional, como sucede con el transportador de alta afinidad de nitrato, Ynt1 (Navarro *et al.*, 2006). La presencia de compuestos nitrogenados en estado reducido como la glutamina provoca una rápida pérdida del transporte de nitrato a través de Ynt1 ya que promueve su degradación vacuolar (Navarro *et al.*, 2006). Sin embargo, en presencia de nitrato se induce la expresión del gen *YNT1* (Brito *et al.*, 1999), la síntesis y la llegada del transportador a la membrana plasmática (Navarro *et al.*, 2006). Nuestros resultados indican que *HpNAR1* tiene expresión constitutiva, independientemente de la fuente nitrogenada presente en el medio. Sin embargo, en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno o en ausencia de ellas, Nar1 podría estar regulado postraduccionalmente de forma similar a Ynt1. Es decir, podría degradarse en presencia de amonio o glutamina y ser más estable en presencia de nitrato o de nitrito (Navarro *et al.*, 2006).

En el estudio de la regulación postraduccional de Nar1 se empleó la fusión de la ORF de *HpNAR1* con el epítipo HA y determinamos los niveles de Nar1-HA en condiciones de ayuno de nitrógeno, en presencia de fuentes preferidas como amonio y glutamina, y no preferidas como nitrato y nitrito. Los resultados muestran que Nar1-HA está presente en ausencia de nitrógeno así como en todas las fuentes de nitrógeno analizadas después de 2 horas (Figura 37). Sin embargo, los niveles de Nar1-HA difieren según la fuente de nitrógeno empleada. En amonio, glutamina y nitrato la cantidad es similar y disminuye en condiciones de ayuno de nitrógeno siendo aún menores en nitrito. Los resultados obtenidos en amonio, nitrato y glutamina corroboran que los niveles de Nar1 son constitutivos de acuerdo con los resultados de expresión génica. Los bajos niveles de proteína obtenidos en ayuno de nitrógeno permitirían a la levadura usar las trazas de nitrito del medio ya que su excreción sería reducida a través de

Nar1, mientras que los niveles observados en nitrito podrían deberse a un efecto derivado de la propia adición del nitrito.

Por otra parte, cabe destacar los cambios observados en la movilidad electroforética de Nar1-HA. El retraso electroforético en nitrato de Nar1-HA es ligeramente menor a los obtenidos en amonio y glutamina. Estos cambios podrían deberse a modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Chang y Slayman, 1991; De Craene *et al.*, 2001; Randez-Gil *et al.*, 1997).

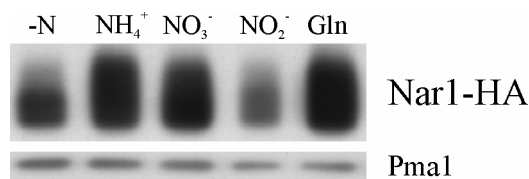


Figura 37. Inmunoblot de Nar1-HA en distintas fuentes de nitrógeno. Las células se crecieron en amonio y después de ser lavadas se incubaron durante 2 horas en YG sin fuente de nitrógeno (-N), 5 mM de amonio (NH₄⁺), 5 mM de nitrato (NO₃⁻), 1 mM de nitrito (NO₂⁻) y 5 mM de glutamina (Gln).

1. 10. 2. Nar1 está fosforilada independientemente de la calidad de la fuente nitrogenada.

El análisis de los sitios potenciales de fosforilación en Nar1 con las herramientas informáticas NetPhosYeast 1.0 Server, NetPhos 2.0 Server (Figura 38) y NetPhosK 1.0 Server predicen la fosforilación de numerosos residuos localizados principalmente en su extremo carboxilo terminal citosólico (Tabla 6). Entre ellos destacan los residuos Ser-298, Ser-327, Ser-462 y Ser-468 como aminoácidos con alta probabilidad de ser fosforilados. Algunos de los residuos fosfoaceptores del extremo C-terminal son posibles sitios de fosforilación de la proteína quinasa A, C y la caseína quinasa II (Tabla 6).

NetPhosYeast (Fosforilación)			NetPhos (Fosforilación)		
Posición	Secuencia	Prob.	Posición	Secuencia	Prob.
298	VRAPSHSAV	0.91	5	MADDTYYLTL	0.69
300	APSHSAVTS	0.69	6	ADDTYYLTLV	0.51
304	SAVTSLNST	0.63	7	DDTYLTLTVH	0.90
322	AYAPSTTER	0.60	9	TYLTLVHEA	0.53
327	TTERSPPGV	0.93	109	RGAVSVVDL	0.99
329	ERSPSPGVFP	0.77	298	VRAPSHSAV	0.91
346	ERERSIAQA	0.87	300	APSHSAVTS	0.59
351	IAQATEDGA	0.55	323	YAPSTTERS	0.63
360	GLRLSLTRG	0.55	324	APSTTERSPP	0.90
365	LTRGSWRRR	0.58	327	TTERSPPGV	0.95
371	RRRATQADA	0.74	329	ERSPSPGVFP	0.99
379	AEAQSDTGS	0.86	346	ERERSIAQA	0.57
381	AQSDTGSRS	0.54	351	IAQATEDGA	0.76
383	SDTGSRSQE	0.76	360	GLRLSLTRG	0.97
385	TGSRSQETT	0.61	365	LTRGSWRRR	0.99
398	VRHLSSARS	0.83	371	RRRATQADA	0.98
402	SSARSRDDM	0.83	278	HLPDYEERD	0.79
414	RKRLSAAGI	0.86	379	AEAQSDTGS	0.93
424	SKIASHSND	0.67	385	TGSRSQETT	0.99
426	IASHSNDIA	0.67	388	RSQETTKDR	0.97
436	IHEGSIDVS	0.54	389	SQETTKDRI	0.58
440	SIDVSYPGP	0.54	398	VRHLSSARS	0.98
454	RRLPTESVD	0.62	399	RHLSSARSR	0.55
456	LPTEVDPA	0.82	402	SSARSRDDM	0.99
462	DPADSPEDS	0.97	414	RKRLSAAGI	0.97
466	SPEDSSSTD	0.65	419	AAGITSKIA	0.57
467	PEDSSSTDE	0.75	424	SKIASHSND	0.97
468	EDSSSTDEK	0.90	440	SIDVSYPGP	0.52
469	DSSSTDEKR	0.76	454	RRLPTESVD	0.74
			456	LPTEVDPA	0.86
			462	DPADSPEDS	0.99
			466	SPEDSSSTD	0.93
			467	PEDSSSTDE	0.99
			468	EDSSSTDEK	0.99

NetPhosK		
Posición	Tipo de señal	Prob.
303	PKC	0.74
323	PKC	0.81
365	PKC	0.79
388	PKC	0.72
399	PKC	0.70
414	PKA	0.76
420	PKC	0.68
468	CKII	0.67

Tabla 6. Principales residuos fosfoaceptores de Nar1 y posibles quinasas implicadas. NetPhosYeast 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/>) identifica los sitios específicos de fosforilación en levaduras. Esta herramienta está construida a partir de una base de datos de proteínas de levaduras donde se han identificado experimentalmente los residuos de serina y treonina que se fosforilan aportando mayor sensibilidad que los predictores de sitios de fosforilación de proteínas de mamíferos. NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) identifica sitios genéricos de fosforilación teniendo en cuenta las correlaciones entre los residuos que rodean al posible residuo fosfoceptor. 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 fosfoceptor (S, T, Y) el programa compara la secuencia circundante con un logo que incluye 12 residuos hacia los extremos amino y carboxilo 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 quinasa, sino que recoge todas las características de los sitios de fosforilación verificados experimentalmente. Los sitios específicos de las quinasas de eucariotas es identificado por NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) en base a conjuntos

de sitios de fosforilación de S, T e Y validados experimentalmente. PKA, proteína quinasa dependiente de AMP cíclico; PKC, proteína quinasa C; CKII, caseína quinasa II.

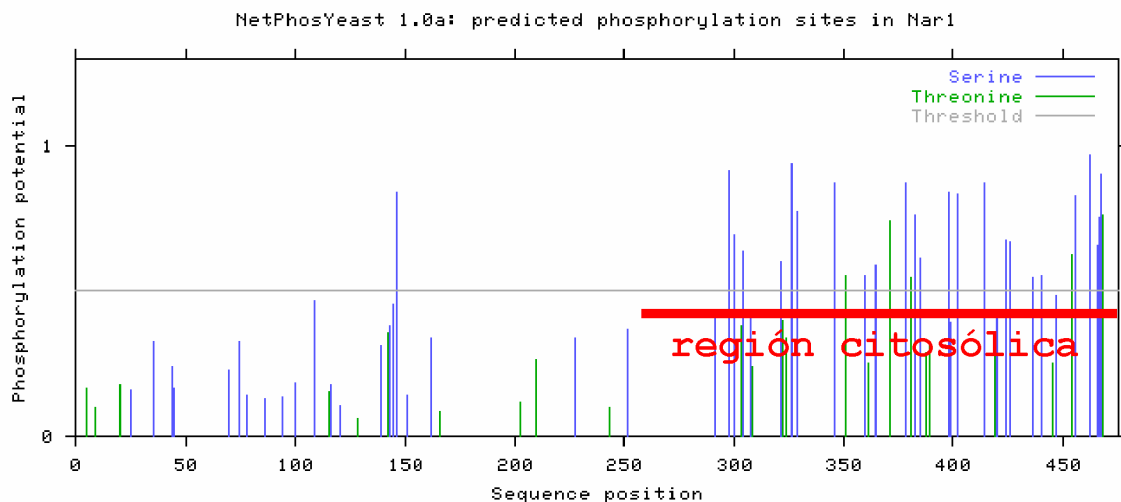


Figura 38. Distribución y probabilidad de putativos sitios de fosforilación de Nar1 según NetPhosYeast 1.0 Server. Las barras verticales corresponden a los posibles residuos fosfoaceptores de Nar1 (S en azul y T en verde). La altura de la barra indica la puntuación que calcula el programa para cada residuo. En rojo se representa la región del extremo C-terminal.

Si la proteína está fosforilada, el grado de asociación de las moléculas de SDS con la proteína varía obteniéndose un retraso en la movilidad electroforética. Podemos determinar si un cambio de movilidad es debido a fosforilación tratando el extracto proteico con λ -proteína fosfatasa. Tras este tratamiento aumentaría la movilidad electroforética como consecuencia de la desfosforilación de la proteína. En el inmunoblot de los extractos proteicos tratados con fosfatasa observamos que Nar1-HA tiene mayor movilidad electroforética respecto de los extractos no tratados (Figura 39).

Por tanto, Nar1 está fosforilada al igual que Ynt1 y otras permeasas (Navarro *et al.*, 2008; Chang y Slayman, 1991; De Craene *et al.*, 2001) aunque desconocemos si el estado fosforilado está asociado con la estabilidad y/o con el estado de activación de Nar1.

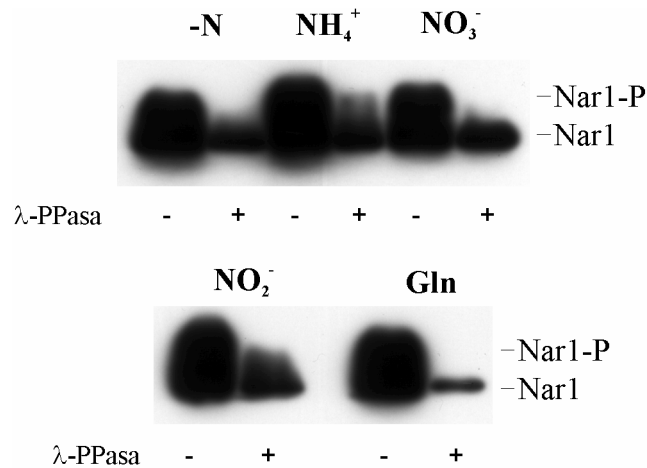


Figura 39. El comportamiento electroforético de *Nar1* se debe a fosforilación. Se prepararon extractos de células incubadas sin nitrógeno (-N), 5 mM de amonio (NH₄⁺), 5 mM de nitrato (NO₃⁻), 1 mM de nitrito (NO₂⁻) y 5 mM de glutamina (Gln) durante 2 h y se trataron con λ-proteína fosfatasa (indicado como λ-PPasa +). Los extractos tratados con λ-proteína fosfatasa se prepararon sin los inhibidores de fosfatasas y kinasas usados rutinariamente (15 mM de EDTA, 15 mM de EGTA, 10 mM de NaN₃, 10 mM de KF, 10 mM de Na₂P₂O₇).

1. 10. 3. Comportamiento de la proteína *Nar1* en diferentes fuentes de carbono.

En *C. reinhardtii* la familia de genes *Nar1* tienen expresión diferencial en función del estado de la fuente de carbono y nitrógeno disponible (Mariscal *et al.*, 2006). En *S. cerevisiae* la ausencia de carbono o de nitrógeno promueve la degradación de Tat2 y Fur4, permeasas de triptófano y de uracilo respectivamente (Beck *et al.*, 1999; Volland *et al.*, 1994). En *H. polymorpha* las fuentes de nitrógeno regulan postraduccionalmente al transportador de nitrato de alta afinidad (Navarro *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2011). Además, en esta levadura la disponibilidad y el tipo de fuente de carbono afectan tanto a la presencia como a la estabilidad de Ynt1. Así, en ausencia de carbono los niveles del transportador descienden rápidamente mientras que en glucosa se estabiliza. En otras fuentes como etanol/glicerol Ynt1 es estable y en sacarosa los niveles de Ynt1 descienden aunque transcurrido cierto periodo es nuevamente detectado (Martín *et al.*, 2011). Este comportamiento de Ynt1 podría responder a la adaptación de la maquinaria enzimática celular frente a estados nutricionales adversos.

Los antecedentes expuestos derivan en la cuestión de si Nar1 de *H. polymorpha* está regulada a nivel postraduccional por las fuentes de carbono. Por ello, se incubó la cepa silvestre portadora de la fusión Nar1-HA en ausencia y presencia de diversas fuentes de carbono. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de inmunoblot muestran que Nar1 está presente en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, aunque modestos, se observan cambios en los niveles de Nar1 después de 4 h de incubación en metanol, así como en la movilidad electroforética de la proteína en este medio y, en menor medida, en ayuno de glucosa (Figura 40). En resumen, las fuentes de carbono usadas no parecen ejercer regulación postraduccional sobre Nar1, aunque el metanol aportó los niveles más bajos de proteína fosforilada así como de proteína total.

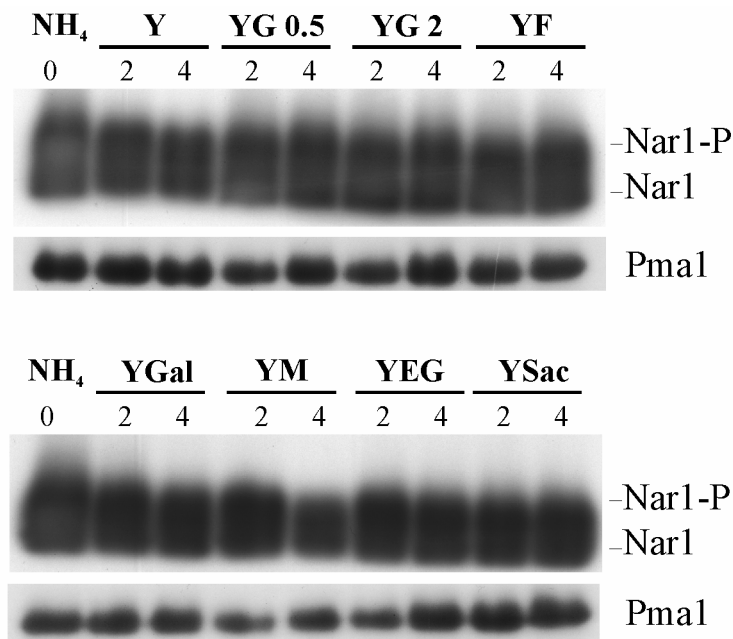


Figura 40. Nar1-HA está presente en distintas fuentes de carbono. Las células se crecieron en amonio y después de ser lavadas se incubaron en medio mínimo sin fuente de carbono (Y), 0,5 % de glucosa (YG0.5), 2 % de glucosa (YG 2), 2 % de fructosa (YF), 2 % de galactosa (YGal), 2 % de metanol (YM), 1 % de etanol/glicerol (YEG) y 2 % de sacarosa (YSac). Se recogieron fracciones a las 2 y 4 h de incubación.

1. 11. Nar1 se localiza fundamentalmente en la superficie celular.

El análisis bioinformático de Nar1 y los ensayos funcionales realizados indican que se trata de una proteína integral de la membrana plasmática. Para

determinar la localización celular de Nar1 se usó la fusión Nar1-GFP. La proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* se ha usado como marcador de la expresión génica y en el estudio de la localización celular de proteínas (Chalfie *et al.*, 1994; Prasher *et al.*, 1992).

La fusión de Nar1-GFP permitió detectar la proteína en la membrana plasmática, aunque la intensidad de la señal obtenida resultó ser débil. Nar1 e Ynt1 están en la membrana plasmática en presencia de nitrato (Figura 41) y como puede observarse la señal de Nar1-GFP obtenida es inferior a la obtenida con Ynt1-GFP. Como se ha mostrado la inducción de *HpNAR1* en nitrato no se modifica sustancialmente con el tiempo, a diferencia de *HpYNT1*.

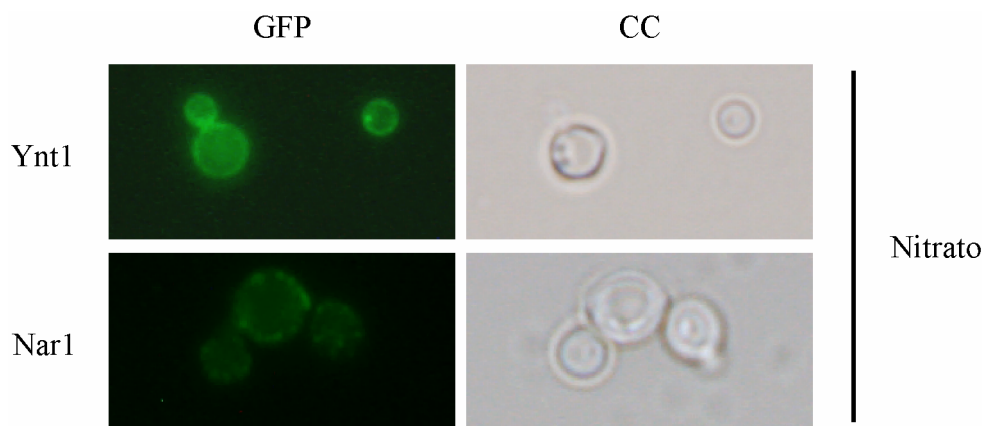


Figura 41. Nar1-GFP está fundamentalmente en la membrana plasmática. Ynt1-GFP y Nar1-GFP se crecieron en medio YGNH hasta la fase exponencial. Se lavaron y se resuspendieron en medio YG al que se adicionó 5 mM de nitrato incubándolas durante 60 min. Ambas proteínas aparecen localizadas en la membrana plasmática. CC = campo claro.

A pesar de la débil señal de fluorescencia de Nar1-GFP, la proteína está presente y localizada en la membrana plasmática no sólo en nitrato sino también en presencia de amonio (Figura 42). En nitrito la señal es aún menor que la observada en los anteriores medios (datos no mostrados). La menor cantidad de Nar1 en nitrito obtenida en los ensayos de inmunoblot podría deberse a un proceso de degradación de la proteína. Sin embargo, Nar1-GFP se localiza en la membrana plasmática y no se detectó su acumulación en la vacuola en este medio.

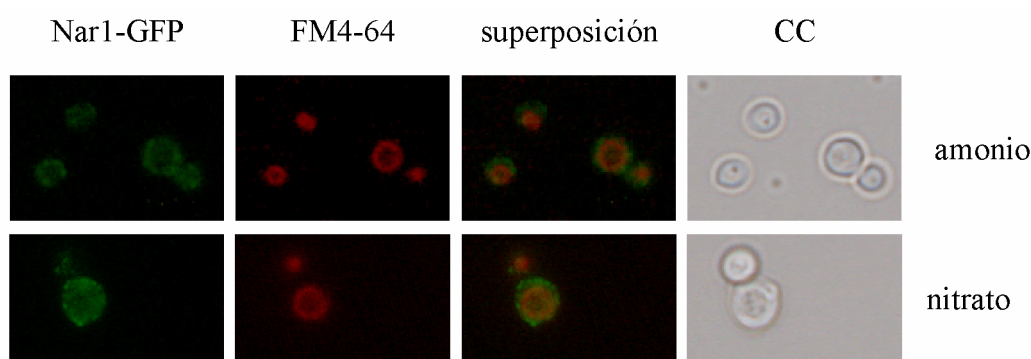


Figura 42. Nar1 se localiza en la membrana plasmática independientemente de la fuente de nitrógeno. Nar1-GFP se creció en amonio hasta la fase exponencial. Se lavaron y se resuspendieron en medio YG al que se adicionó 5 mM de amonio o de nitrato incubándolas durante 60 min. Antes de transferir las células a las distintas fuentes de nitrógeno se realizó la tinción de las vacuolas con el colorante FM4-64. CC = campo claro.

1. 12. Efecto de *Nar1* y *Ssu2* sobre la regulación del transportador de nitrato de alta afinidad, *Ynt1*.

Como se ha expuesto anteriormente *Ssu2* y *Nar1* están implicados en la excreción de nitrato y, en el caso de *Nar1*, además en la salida de nitrito. La incapacidad de excretar nitrato y nitrito de las células afecta tanto al crecimiento (Figura 27) como a la viabilidad celular (Figura 32 y 33). Además, estudios previos realizados en nuestro grupo han descrito que los niveles de *Ynt1* disminuyen en presencia de nitrito (Navarro *et al.*, 2008), lo que nos llevó a cuestionarnos cómo responde la proteína *Ynt1* en las cepas afectadas en *HpSSU2* y *HpNAR1*, es decir, en aquellas cepas con alteraciones en la excreción del nitrato y nitrito intracelular. Nuestro grupo ha estudiado los niveles de *Ynt1* tras la incubación de $\Delta ssu2$ y *nSSU2* en 1 mM de nitrato durante intervalos cortos de tiempo. Los resultados mostraron un incremento de los niveles de *Ynt1* en $\Delta ssu2$, mientras que *nSSU2* presentó niveles inferiores respecto de los obtenidos en la cepa silvestre (Cabrera, tesis doctoral, 2011). Estos resultados están en concordancia con lo esperado, ya que en $\Delta ssu2$ la acumulación de nitrato intracelular aumenta la inducción de los genes de la vía de asimilación, a diferencia de lo que ocurre en *nSSU2* donde la inducción por nitrato es menor. Por otra parte, los niveles de *Ynt1* obtenidos en $\Delta nar1$ son similares a los de la

cepa silvestre, y ligeramente inferior en *nNARI* (Figura 43). En estas condiciones la mayor acumulación de nitrito en $\Delta nar1$ no reproduce los niveles de Ynt1 observados en $\Delta ssu2$, sin embargo, la cepa *nNARI* se comporta de forma similar a *nScSSUI* (con varias copias de *SSUI* de *S. cerevisiae*), en cuanto a la elevada tasa de excreción de nitrito, donde los niveles de Ynt1 en ambas cepas son inferiores en relación con los obtenidos en la cepa silvestre (Cabrera, tesis doctoral, 2011). La sobreexpresión de *HpNARI* conlleva una mayor excreción de nitrito al medio de cultivo, lo que podría afectar a los niveles de Ynt1 detectados.

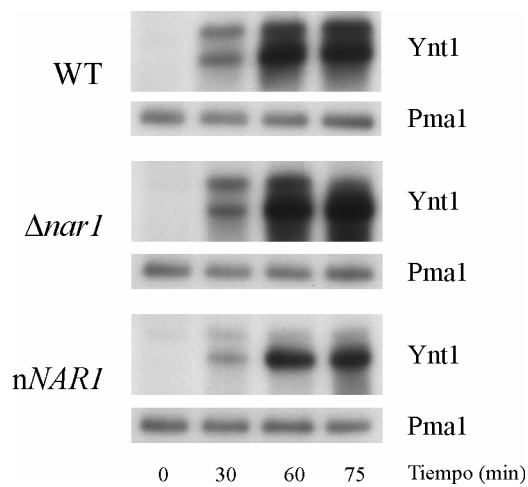


Figura 43. Inmunoblot de Ynt1. Las células crecidas en medio YGNH hasta 10 mg/ml se lavaron y se incubaron en YG al que se adicionó 1 mM de nitrato, retirando las muestras a los tiempos indicados.

Dado que $\Delta ssu2$ acumula nitrato (Figura 28) (elevada tasa de excreción de nitrito -Figura 32 C-), y $\Delta nar1$ acumula más nitrito (baja excreción) respecto de la cepa silvestre, empleamos las cepas $\Delta yni1\Delta nar1$ e $\Delta yni1\Delta ssu2$, incapaces de sintetizar amonio, con el fin de determinar cuál es el origen del nitrito que regula la cantidad de Ynt1 en la membrana plasmática. En 5 mM de nitrato los niveles de Ynt1 en $\Delta yni1\Delta nar1$ (con alto contenido de nitrito citoplasmático -Figura 44 A-) son mayores que los obtenidos en $\Delta yni1$ (bajo contenido de nitrito intracelular -Figura 44 A-), donde los niveles del transportador disminuyen con el tiempo (Figura 44 C). Por otra parte, la cepa $\Delta yni1\Delta ssu2$ (con un contenido de nitrito similar al de $\Delta yni1$ -Figura 44 A- y mayor excreción de nitrito -Figura 44

B-), presenta bajos niveles de Ynt1 en relación con los obtenidos en $\Delta yni1$ (Figura 44 C).

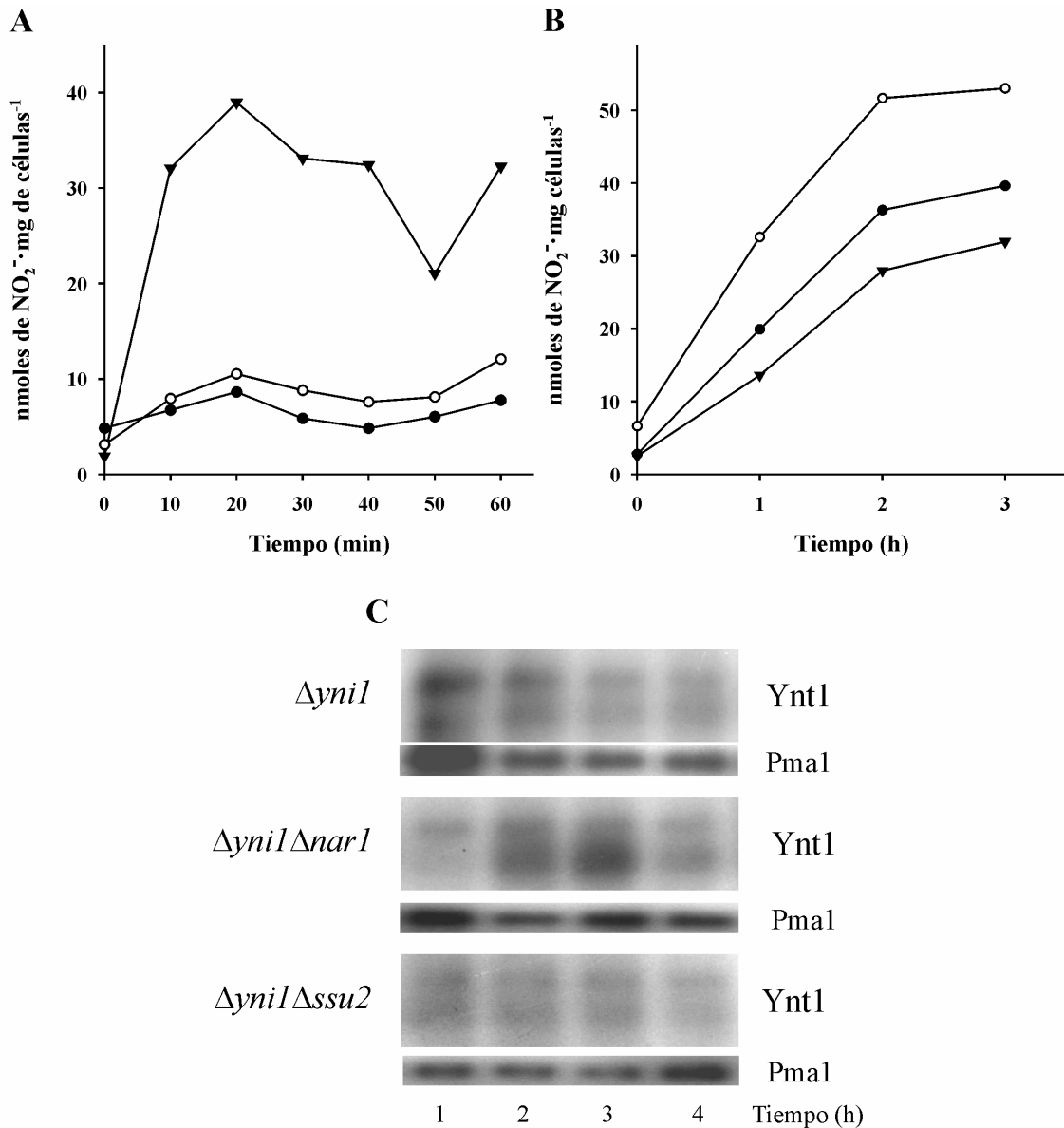


Figura 44. El nitrito extracelular disminuye los niveles de Ynt1. A. Acumulación de nitrito. Las células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml se lavaron con agua MilliQ y se mantuvieron en ayuno de nitrógeno durante 120 min. A continuación se adicionó 1 mM de nitrito al medio de cultivo y a los tiempos indicados se determinó el nitrito intracelular. **B. Excreción de nitrito.** Las células crecidas como en el apartado A y una vez lavadas se resuspendieron en YG al que se adicionó 2 mM de nitrato. Las células analizadas son $\Delta yni1$ (●), $\Delta yni1 \Delta ssu2$ (○) e $\Delta yni1 \Delta nar1$ (▼). En ambos apartados se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. **C. Inmunoblot de Ynt1.** Las células crecidas como en el apartado A y una vez lavadas se resuspendieron en YG al que se adicionó 1 mM de nitrato. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada cultivo para analizar la cantidad de transportador presente en cada cepa.

La inducción de los genes de la vía de la asimilación de nitrato precisa de la entrada del nitrato al interior de la célula. Por tanto, los niveles de Ynt1 dependen del nitrato intracelular. Sin embargo, Ynt1 no parece estar afectado por el nitrito intracelular ya que es en $\Delta yni1\Delta nar1$ donde se observan los mayores niveles del transportador siendo esta cepa la que acumula más nitrito. En $\Delta yni1\Delta ssu2$ la acumulación de nitrito es baja pero su tasa de excreción es casi el doble de la que presenta $\Delta yni1\Delta nar1$. Así, el nitrito y, más concretamente, el nitrito extracelular parece ser el responsable de disminuir los niveles de Ynt1 incluso en presencia de nitrato. Para determinar si es el nitrito extracelular el responsable de los bajos niveles de Ynt1 incubamos las células $\Delta yni1$ en 5 mM de nitrato durante una hora, previamente a la adición de 1 mM de nitrito. Como hemos visto $\Delta yni1$ prácticamente no varía el contenido de nitrito intracelular. Los niveles de Ynt1 detectados en presencia de nitrato van en aumento con el tiempo, pero disminuyen al adicionar el nitrito al medio (Figura 45). Por tanto, la cantidad de Ynt1 es menor cuando aumenta la concentración de nitrito en el medio de cultivo, independientemente de la cantidad de nitrato y/o nitrito intracelular.

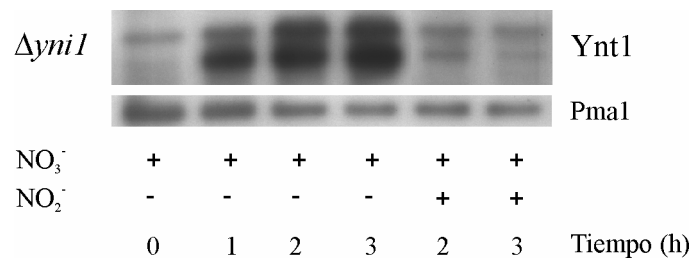


Figura 45. La cantidad de Ynt1 está regulada por la concentración de nitrito del medio de cultivo. Las células crecidas en medio YGNH hasta 10 mg/ml se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en YG al que se adicionó 5 mM de nitrato. Transcurrida una hora de inducción se adicionó 1 mM de nitrito a uno de los cultivos. A los tiempos indicados se retiraron muestras para analizar la presencia de Ynt1 en la membrana plasmática.

Discusión

El proceso de excreción de nitrato y nitrito evita la acumulación tóxica del nitrito en *H. polymorpha*. Nar1 excreta nitrato y nitrito aunque parece tener más afinidad por nitrito.

HpNAR1 es el único gen obtenido al comparar la secuencia aminoacídica de los transportadores de nitrato y nitrito de alta afinidad de varios organismos con la secuencia de proteínas de *H. polymorpha*. Nar1 comparte similitud de secuencia con las proteínas de la familia de transportadores de formiato y nitrito (FNT), abundantes en los genomas de procariotas y escasa en eucariotas (levaduras, hongos, protozoos y algas) (Mariscal *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos a través de las herramientas bioinformáticas y de *southern blot* indican que no existen más genes de esta familia en *H. polymorpha*. La proteína Nar1 de *H. polymorpha*, con 476 aminoácidos y seis putativos dominios trasmembrana, junto con NAR1.3 de *C. reinhardtii*, de 561 aminoácidos (Mariscal *et al.*, 2006) y Yhl008c de *S. cerevisiae*, de 627 aminoácidos, son las proteínas de mayor tamaño de la familia FNT identificadas hasta el momento en eucariotas.

Nar1-GFP de *H. polymorpha* está localizada en la membrana plasmática, independientemente de la fuente nitrogenada en la que se incuban las células (amonio, nitrato o nitrito), aunque la intensidad de la señal de fluorescencia es débil en nitrito. Otros transportadores FNT también se localizan en la membrana plasmática o en la membrana del cloroplasto. NitA, el transportador de nitrito de alta afinidad implicado en la excreción del nitrito intracelular en *A. nidulans*, está localizado en la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2008), mientras que en *C. reinhardtii* los transportadores NAR1.1, NAR1.2 y NAR1.5 se localizan en la membrana del cloroplasto (Mariscal *et al.*, 2006). El comportamiento de Nar1-GFP es diferente al transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad, Ynt1. Nar1-GFP está en la membrana plasmática después de incubaciones prolongadas en nitrato mientras que Ynt1-GFP se ubica principalmente en la vacuola ya que la

síntesis de amonio y/o glutamina desencadenan el proceso de degradación vacuolar (Navarro *et al.*, 2006). Por otra parte, Nar1-GFP está en la membrana plasmática tanto en amonio como en nitrato mientras que Ynt1-GFP sólo está presente en nitrato y no se observa en amonio o glutamina (Navarro *et al.*, 2006). Además, la presencia de Nar1-HA en diferentes fuentes de nitrógeno también indica que su regulación a nivel postraduccional difiere de la de Ynt1: i) Nar1-HA está presente y en estado fosforilado independientemente de la fuente nitrogenada o de carbono presente en el medio, mientras que Ynt1 está fosforilado en nitrato o en ausencia de nitrógeno (Navarro *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2011); ii) Los niveles de Nar1-HA son superiores en amonio, glutamina y nitrato en relación con los obtenidos en nitrito y en ayuno de nitrógeno, mientras que Ynt1 se ubiquitina y se degrada en la vacuola cuando se adicionan fuentes de nitrógeno reducidas (amonio o glutamina) o en ausencia de glucosa (Navarro *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2011). Los bajos niveles de Nar1-HA detectados en ayuno de nitrógeno podrían favorecer la asimilación de las trazas de nitrato y nitrito del medio. Sin embargo, el hecho de obtener bajos niveles de Nar1-HA en nitrito es llamativo ya que éste es su sustrato. No obstante, éste comportamiento no es exclusivo de Nar1 ya que los niveles del transportador de alta afinidad de nitrito, también disminuyen cuando se adiciona nitrito al medio de cultivo (Navarro *et al.*, 2008). El hecho de que los niveles de Nar1-HA y de Ynt1 desciendan en nitrito podría deberse a un efecto derivado de la propia exposición de las células al nitrito. Esto explicaría que la señal de Nar1-GFP sea débil en nitrito y que la actividad β -galactosidasa de *NAR1-lacZ* en nitrito esté disminuida *in vivo*.

Los resultados de RT-PCR y β -galactosidasa muestran que la expresión de *HpNAR1* es ligeramente superior en nitrato respecto de amonio. A diferencia del resto de los genes de la vía de asimilación de nitrato, *HpNAR1* se expresa en presencia de amonio, lo que indica que su expresión es constitutiva. De hecho el promotor de *HpNAR1* carece de los dominios de unión de los factores transcripcionales tipo GATA, implicados en la desrepresión catabólica por

nitrógeno. Otros genes implicados en la excreción de nitrito o en su transporte hacia los cloroplastos presentan mecanismos de regulación génica independientes de la presencia o la calidad de la fuente nitrogenada. Uno de ellos es el gen *nark2* de *Mycobacterium bovis*, que codifica una proteína putativa de salida de nitrito de la superfamilia mayor de facilitadores (MFS), cuya expresión está regulada por la presencia o ausencia de oxígeno. El gen *nark2* se expresa en anaerobiosis, sin embargo, su expresión no se altera por la adición de nitrato al medio de cultivo en condiciones de hipoxia (Hutter y Dick *et al.*, 2000). Otro ejemplo es la expresión de *CsNitr1-L* de *C. sativus*, un transportador de alta afinidad de nitrito del cloroplasto. Este gen se expresa en ausencia de nitrógeno y aumenta al adicionar nitrato, pero la adición de amonio al medio ni induce ni reprime la expresión inducida en nitrato (Sugiura *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que las proteínas FNT funcionan como transportadoras de aniones derivados del nitrógeno y del carbono. Nar1 no parece transportar nitrito hacia interior de la célula, ya que $\Delta ynt1\Delta nar1$ crece y transporta nitrito con la misma tasa que $\Delta ynt1$ (ver tabla 5 y Figura 17). Sin embargo, a pesar de que Nar1 no transporta el nitrito desde el medio extracelular, $\Delta nar1$ consume menos nitrato y nitrito que la cepa silvestre (Figura 15). El menor consumo de nitrato en el mutante podría deberse a la propia acumulación de nitrito intracelular: El nitrito acumulado en $\Delta nar1$ induce a *HpSSU2* favoreciendo la excreción de nitrato al medio extracelular (Cabrera, tesis doctoral, 2011), de tal forma que el consumo de nitrato es bajo. Por otra parte, *nNAR1* no acumula nitrito y en consecuencia la excreción de nitrato a través de *Ssu2* es baja, obteniendo mayor consumo de nitrato. A su vez $\Delta nar1$ tiene baja tasa de consumo de nitrito lo que podría deberse a la progresiva acumulación de nitrito en esta cepa. La cepa portadora de varias copias de *HpNAR1* consume menos nitrito que la cepa silvestre, ya que el nitrito transportado al interior es mayoritariamente excretado en la cepa *nNAR1*. Desconocemos si Nar1 está implicado en el transporte de compuestos carbonados como sucede con *NAR1.2* de *C. reinhardtii*, implicada en el transporte de nitrito y bicarbonato (Mariscal *et*

al., 2006). La proteína Yhl008c de *S. cerevisiae* se propuso como un H⁺ simporte de acetato debido a su homología con los transportadores de formiato-nitrito de bacterias (Paulsen *et al.*, 1998), aunque posteriormente se descartó su función como transportador de monocarboxilatos (Makuc *et al.*, 2001). Los últimos estudios muestran que la delección del gen *YHL008c* reduce el flujo de Cl⁻ a través del transportador de Cl⁻ de alta afinidad, proponiendo que Yhl008c actúa como un sensor de Cl⁻ (Jennings y Cui, 2008).

En *H. polymorpha* la concentración de nitrato intracelular depende tanto de la tasa de reducción a nitrito como de la excreción a través de Ssu2 y de Nar1. El hecho de que la excreción de nitrato esté mediada por varias proteínas sugiere que los niveles de nitrato intracelular no han de superar cierto valor, asegurando su asimilación, y evitando la acumulación intracelular del mismo y en consecuencia de nitrito. La acumulación intracelular de nitrato está ampliamente descrita en plantas y en algunos microorganismos como *Beggiatoa* spp (Mackown *et al.*, 1981, Breteler y Nissen, 1982, Aslam *et al.*, 1993 y 1996, Sivasankar *et al.*, 1997, Fraisier *et al.*, 2000, Quaggiotti *et al.*, 2003). Esta bacteria filamentosa acumula entre 3 a 4 veces más nitrato en la vacuola respecto de los niveles que alcanza en el ambiente, empleándolo como aceptor final de electrones en la respiración (McHatton *et al.*, 1996). Sin embargo, aunque *H. polymorpha* usa el nitrato como fuente de nitrógeno no lo acumula (datos no mostrados). Sólo se observa cierta acumulación de nitrato intracelular en $\Delta ynr1$ que incrementan notablemente en las cepas $\Delta ynr1\Delta nar1$ e $\Delta ynr1\Delta ssu2$, confirmando que tanto Nar1 como Ssu2 intervienen en la excreción del nitrato (Figura 28). El flujo de salida aportado por cada proteína es distinto y varía con los niveles intracelulares de nitrato. El nitrato acumulado por la cepa $\Delta ynr1\Delta nar1$ sólo supera al de $\Delta ynr1\Delta ssu2$ a partir de los 80 min desde su adición al medio, obteniendo en $\Delta ynr1\Delta nar1$ entre 2 a 3 veces más nitrato intracelular a los 120 min de incubación (Figura 28, Figura 29). Sin embargo, a intervalos de tiempo corto la mayor concentración de nitrato intracelular se detectó en $\Delta ynr1\Delta ssu2$ (Figura 30 A). Por tanto, en $\Delta ynr1\Delta ssu2$ el nitrato se acumula alcanzando

concentraciones intracelulares lo suficientemente elevadas que son excretadas a través de Nar1, impidiendo el incremento en la concentración de nitrato intracelular. Por otra parte, la cepa $\Delta ynr1\Delta nar1$ no acumula nitrato a tiempos cortos por lo que el nitrato abandona la célula a través de Ssu2. Los valores finales de acumulación obtenidos en $\Delta ynr1\Delta nar1$ indican que la excreción de nitrato a través de Ssu2 es insuficiente para evitar su acumulación. Por tanto, Nar1 presenta una tasa de excreción de nitrato superior a la de Ssu2. La acción secuencial de Nar1 y Ssu2 en $\Delta ynr1$ se puede resumir como sigue: el nitrato adicionado al medio es transportado al interior donde se acumula. Parte del nitrato intracelular regresa al medio de cultivo a través de Ssu2. Cuando los niveles de nitrato intracelular aumentan hasta aproximadamente 60 nmoles de nitrato/mg de células la excreción de nitrato a través de Ssu2 es máxima de tal forma que el nitrato que sigue entrando en la célula también es excretado a través de Nar1. Por tanto, la proteína Nar1 parece mostrar una baja afinidad por nitrato y alta capacidad de transporte, mientras que Ssu2 se caracteriza por mostrar baja capacidad de transporte aunque su afinidad por el nitrato es superior a la de Nar1. La máxima acumulación de nitrato en *H. polymorpha* se obtiene al combinar las deleciones de *HpYNR1*, *HpNAR1* y *HpSSU2*; sin embargo, los niveles de nitrato intracelular podrían ser mayores si existieran más sistemas implicados en su excreción. La presencia de varios sistemas implicados en la salida de nitrato no es una característica exclusiva de *H. polymorpha*. En las raíces de *Arabidopsis thaliana* se identificó la primera proteína transportadora de nitrato hacia el medio externo, denominada NAXT1. Además de NAXT1, el transporte pasivo de nitrato al exterior está mediado al menos por una de las otras siete proteínas NAXT pertenecientes a la familia NRT1/PTR (Segonzac *et al.*, 2007). En raíces de *Zea mays* el nitrato tiene un movimiento bidireccional hacia el interior de la célula y al medio. Esta salida sostenida de nitrato también sucede en plántulas de *Triticum sativa*, constituyendo la principal causa de disminución de nitrato en el tejido (Mackown *et al.*, 1981). En raíces de *Phaseolus vulgaris* el flujo de salida depende tanto de la asimilación del nitrato como de su concentración en el medio externo (Breteler y Nissen, 1982). Además, la adición de nitrato a las raíces de *H.*

vulgare eleva la concentración de nitrato citoplasmático incrementando a su vez la excreción, siendo éste el componente que más influye en el transporte neto de nitrato (Deane-Drummond y Glass, 1983). Por otra parte, la aplicación del elicitor *cryptogen* aislado del hongo *Phytophthora criptogea* a plantas de tabaco produce una excreción rápida del nitrato a través de los canales de aniones, por lo que se ha relacionado la salida de nitrato con la respuesta de defensa de la planta (Wendehenne *et al.*, 2002).

La principal función de Nar1 es la de transportar el nitrito hacia el medio de cultivo tal y como indican los resultados obtenidos a partir del crecimiento y contenido intracelular de nitrito. Nar1, a diferencia de Ssu2, es el único sistema de transporte del nitrito intracelular hacia el medio de cultivo identificado hasta el momento en *H. polymorpha*. Sin embargo, la levadura dispone de al menos otro sistema más que transporta el nitrito hacia el exterior. Las evidencias que de las que disponemos son: i) la cepa $\Delta nar1$ presenta una baja tasa de excreción de nitrito (Figura 14), ii) la cepa $\Delta nar1\Delta ssu2$ presenta tasas de excreción de nitrito ligeramente superiores a la cepa silvestre al incubar las células en presencia de 1 mM de nitrato (Figura 32 C), iii) el nitrito acumulado en la célula disminuye rápidamente en la cepa $\Delta yni1\Delta nar1$ en presencia de nitrato (Figuras 21 y 25) y lentamente en nitrito (Figura 22) y iv) la cepa $\Delta yni1\Delta nar1$ excreta más nitrito que la cepa $\Delta yni1$ en nitrato 5 mM (Figura 23). Por tanto *H. polymorpha* dispone al menos de dos sistemas por los que excreta el excedente de nitrito citoplasmático, siendo uno de ellos Nar1.

La conformación de las proteínas FNTs ha dado lugar al debate de si deben ser consideradas como transportadoras o como canales (FNCs). Los canales median el transporte pasivo de iones a través de la membrana. La difusión de estos iones depende principalmente del voltaje y de la diferencia de concentraciones de los iones a través de la membrana. Estos transportadores pasivos se caracterizan por ser selectivos, es decir, presentan sitios de unión implicados en el reconocimiento del ión transportado. Sin embargo, muchos

canales son capaces de transportar un amplio rango de iones siguiendo una secuencia de selectividad iónica que además varía en función de las condiciones fisiológicas. Así, algunos canales de K^+ transportan Na^+ de forma limitada, lo que podría repercutir en la tolerancia de las plantas frente a la salinidad (Schachtman *et al.*, 1991). Otra característica de los canales es su capacidad para mantener los estados conformacionales “abierto” (es decir, en estado activo) y “cerrado” (o estado inactivo) en respuesta a la presencia de ligandos o a un cambio en el voltaje de la membrana (Maathuis *et al.*, 1997). La estructura cuaternaria de FocA de *E. coli*, perteneciente a la familia FNT, está constituida por la asociación de protómeros que forman un pentámero (Wang *et al.*, 2009), característica que comparte con otros canales como las acuoporinas, permeables al agua y a otras moléculas orgánicas pequeñas como el glicerol (Stroud *et al.*, 2003; Carbrey y Agre, 2009). La proteína NitA de *A. nidulans*, otra proteína de la familia FNT, es un tetrámero (Beckham *et al.*, 2010) caracterizada como un transportador de nitrito de alta afinidad ($K_m = 4.1 \mu M$) (Wang *et al.*, 2008). Por tanto, la pertenencia de una proteína a esta familia indica de que pudieran tratarse de canales o transportadores de aniones. Nar1 de *H. polymorpha* parece comportarse principalmente como un transportador de nitrito hacia el medio extracelular, sin embargo, es necesario establecer sus parámetros cinéticos. La expresión de Nar1 en oocitos de *Xenopus* permitiría determinar, además de estos parámetros, otros posibles sustratos como los descritos en otros miembros de la familia FNT. La purificación de Nar1 permitiría analizar si tiene una estructura cuaternaria similar a otros canales tal y como se ha descrito con FocA de *E. coli*.

Los estudios de la regulación postraduccional del transportador de nitrato de alta afinidad desarrollados en nuestro grupo mostraron bajos niveles de Ynt1 al incubar las células en presencia de nitrito (Navarro *et al.*, 2008). En este aspecto hemos determinado que la disminución de los niveles de Ynt1 depende principalmente de la concentración de nitrito presente en el medio de cultivo. El uso de las cepas afectadas tanto en la reducción del nitrito ($\Delta yni1$) como en los sistemas de salida de nitrato (Ssu2, Nar1) y de nitrito (Nar1) muestra que es el

nitrito extracelular, y no el acumulado, el que regula los niveles de Ynt1. Además, hemos observado que el nitrito disminuye los niveles de Ynt1 aún en presencia de nitrato en las condiciones ensayadas (Figura 45). Como hemos mencionado anteriormente, los niveles de Nar1-HA también disminuyen al incubar las células en nitrito. Aunque no podemos afirmar que Ynt1 esté regulado postraduccionalmente por nitrito, la adición de nitrito al medio de cultivo es responsable los menores niveles de Ynt1 y de Nar1-HA lo que podría deberse a un efecto general de la adición de nitrito.

El nitrito es un compuesto tóxico que afecta al metabolismo celular, aunque se considera que la toxicidad de las soluciones que contienen nitrito son debidas al HNO_2 ($\text{p}K_a$ 3.37), al NO^+ y al ONOO^- . Las soluciones cuyo pH está en el rango de 4 a 6 provocan prácticamente la misma reducción en el crecimiento de las plantas que la producida por la adición de nitrito (Lee, 1979). Esta restricción en el crecimiento también se produce en la cepa silvestre de *H. polymorpha*, incapaz de crecer en presencia de nitrito cuando el pH del medio líquido es inferior a 4.5 (datos no mostrados). El pH del medio de cultivo de levaduras alcanza valores de pH tan bajos como 3.5 cuando el medio alcanza la fase de crecimiento estacionario (Salhany *et al.*, 1975). Las células de levadura son capaces de mantener el pH intracelular entre 6 y 7.5 gracias a la activación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Eraso y Gancedo, 1987; Serrano, 1993). La adición de nitrito a los medios de cultivo de *S. cerevisiae* produce un descenso rápido en el contenido de ATP, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ATP ligada a la degradación glicolítica de la glucosa (Hinze y Holzer, 1986). En otras levaduras como *Debaryomyces hanseii* y *Candida zeylanoides* la adición de nitrito al medio de cultivo acidificado (pH 4.5) provoca una fuerte inhibición del crecimiento y la acidificación intracelular (Mortensen *et al.*, 2008). Por tanto, los organismos capaces de crecer en presencia de nitrito deben regular su transporte y reducción a amonio, así como disponer de los mecanismos que le permitan descartar el nitrito no reducido. De hecho si Nar1 no es funcional las células no crecen en nitrito (Figura 27 B). Este comportamiento

es debido al efecto tóxico del nitrito acumulado en $\Delta narI$, indicando a su vez que NarI es el principal transportador implicado en la excreción de nitrito en *H. polymorpha*. En *E. coli* se han descrito tres proteínas integrales de la membrana plasmática, NarK, NarU y el transportador NirC de la familia FNT, implicadas en la excreción del nitrito. La mayor parte del nitrito producido por la reducción del nitrato es expulsado a través de NarK, durante la respiración anaeróbica del nitrato (DeMoos y Hsu, 1991; Rowe *et al.*, 2009) y de NarU en la fase de crecimiento estacionario (Clegg *et al.*, 2002), ingresando en la célula a través de NirC, el transportador específico de nitrito, implicado también en su excreción (Jia *et al.*, 2009). En *A. nidulans* el transportador FNT específico de nitrito NitA disminuye la concentración del nitrito citoplasmático cuando las condiciones de entrada y reducción de nitrato exceden la capacidad de asimilación por el hongo (Wang *et al.*, 2008). En *C. reinhardtii* los transportadores NAR1.1 y NAR1.2 de la familia FNT están implicados, respectivamente, en el transporte de nitrito y de nitrito-bicarbonato al interior del cloroplasto (Fernández y Galván, 2007). Por tanto, algunas proteínas de esta familia transportan el nitrito hacia el medio extracelular impidiendo su acumulación intracelular, o hacia el cloroplasto donde es reducido a amonio. En *H. polymorpha* la excreción de nitrito resulta imprescindible para el crecimiento y para la viabilidad celular. La incubación de $\Delta narI$ y $nNAR1$ en nitrito afecta notablemente a la viabilidad celular de ambas cepas (Figura 33). El efecto tóxico del nitrito en $\Delta narI$ se debe principalmente a la acumulación intracelular del mismo, mientras que la baja viabilidad de $nNAR1$ (Figura 33) puede ser consecuencia del gasto energético que le supone a esta cepa mantener la elevada tasa de excreción de nitrito (Figura 14). En nitrato la viabilidad de $nNAR1$ es aún menor (Figura 32 A) que en nitrito lo que podría deberse al gasto extra del NAD(P)H necesario en la reducción del nitrato a nitrito. Por tanto, la homeostasis del nitrito depende de la excreción mediada por NarI preservando a la célula de su efecto tóxico (Figura 46).

En resumen, el transporte de nitrato en *H. polymorpha* lleva asociado el proceso de excreción de nitrato, a través de Ssu2 y de NarI, y del nitrito no

asimilado, a través de Nar1. La excreción de nitrato y nitrito a través de Nar1 evitan la acumulación tóxica del nitrito resultando esencial para el crecimiento de la levadura en condiciones de disponibilidad de nitrato y/o nitrito.

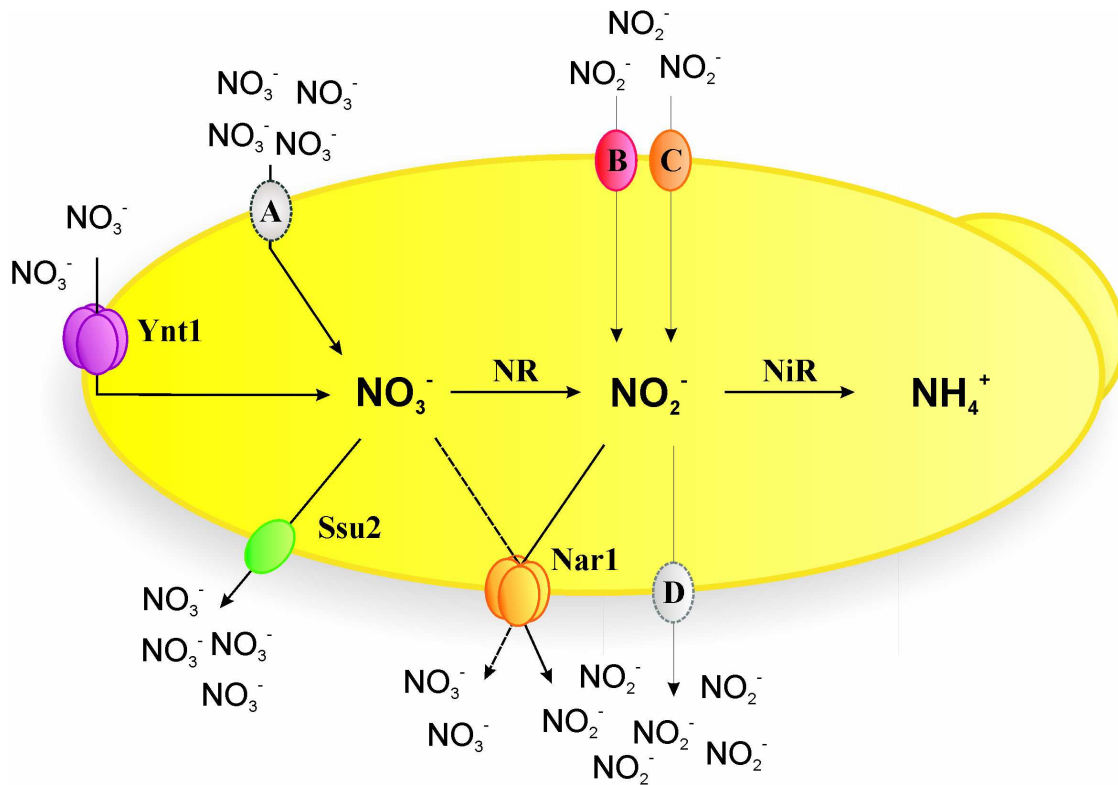


Figura 46. Esquema de los sistemas de transporte de nitrato y nitrito en *H. polymorpha*. El nitrato es transportado por Ynt1 y por un sistema de transporte de nitrato de baja afinidad (A). Una vez en el interior la nitrato reductasa (NR) lo reduce a nitrito. El nitrito es transportado por varios transportadores. Uno de ellos es Ynt1, el otro es el sistema de alta afinidad inducido por nitrato (B) y un tercer sistema de actividad constitutiva que muestra mayor transporte al ser inducido en nitrito (C). La nitrito reductasa (NiR) reduce el nitrito a amonio aunque el excedente de nitrito no asimilado se excreta mayoritariamente a través de Nar1 y al menos de un sistema aún no caracterizado (D). El nitrato intracelular es excretado en primer lugar a través de Ssu2 y una vez que este sistema se satura la excreción de nitrato tiene lugar a través de Nar1, aunque su afinidad parece ser mayor por nitrito.

2. Chl1 participa en la excreción de aminoácidos en *H. polymorpha*.

El nitrato entra en las células de *H. polymorpha* a través de Ynt1 y al menos de otro sistema de baja afinidad cuya identificación ha sido uno de los objetivos de este trabajo. En este capítulo describimos el papel de una permeasa, con similitud a los transportadores de nitrato de baja afinidad de diversos organismos. Nuestros resultados sugieren que Chl1 no está implicada en el transporte de nitrato sino en la excreción de aminoácidos. Al igual que la excreción de nitrito, la excreción de aminoácidos constituye un mecanismo de detoxificación celular del amonio, otro de los intermediarios tóxicos obtenidos en la reducción del nitrato.

2.1. El gen *HpCHL1* codifica una proteína con similitud a los transportadores de nitrato de baja afinidad de la familia NRT1.

En la búsqueda de posibles genes que codificaran proteínas con características similares a los transportadores de baja afinidad de nitrato se usaron las secuencias de los transportadores de nitrato de baja afinidad presentes en algas y plantas (ver Tabla 7). Cuando usamos las proteínas NRT1.2 de *Z. mays*, NRT1.1 de *T. aestivum* y NRT1 de *H. vulgare* en el BLAST para rastrear su similitud con las proteínas de la base de datos de *H. polymorpha* encontramos una proteína con similitud a los transportadores de oligopéptidos dependientes de protones, a la que denominamos Chl1 por pertenecer a la misma familia que el transportador de nitrato AtNRT1.1 (CHL1) de *A. thaliana*. La secuencia de Chl1 de *H. polymorpha* presenta una similitud del 48 % con la secuencia del transportador de di- y tripéptidos de *S. cerevisiae*, PTR2, perteneciente a la superfamilia mayor de facilitadores (MFS) y más concretamente a la familia NRT1. Debido a que casi todos los homólogos a NRT1 identificados en animales, bacterias y hongos poseen la capacidad de transportar péptidos y no nitrato, la familia de genes *NRT1* también ha sido denominada como familia PTR (*Peptide Transporter*) (Steiner *et al.*, 1995).

Recientemente se ha secuenciado el genoma de la estirpe NCYC 495 leu1.1 de *H. polymorpha* cuya base de datos es de acceso libre por lo que hemos realizado nuevamente el análisis comparativo de los transportadores de nitrato de baja afinidad con las contenidas en dicha aplicación bioinformática (Grigoriev *et al.*, 2011). Los resultados de esta nueva búsqueda aportaron similitud de secuencia de las proteínas Nrt1.1 de *Oriza sativa* y *NRT12.3* de *C. reinhardtii* con Ynt1 de *H. polymorpha*, el transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad (Pérez *et al.*, 1997; Machín *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2011). Sin embargo, no se han hallado nuevas secuencias con similitud a transportadores de nitrato de baja afinidad a parte de HpCh11.

Gen	Especie	Familia	Sustrato	GeneBank
<i>AtNRT1.1</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	AAA32770.1
<i>AtNRT1;2</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	AEE34991.1
<i>AtNRT1.3</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	?	Q9LVE0.1
<i>AtNRT1.4</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	Q9SZY4.1
<i>AtNRT1.5</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	AEE31488.1
<i>AtNRT1.6</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	Q9LFX9.2
<i>AtNRT1.7</i>	<i>A. thaliana</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	AEE34993.1
<i>BnNRT1;2</i>	<i>Brassica napus</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻ /His	U17987.1
<i>CrNRT2.3</i>	<i>C. reinhardtii</i>	NRT2	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	EDP02491.1
<i>HvNRT1</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	NRT1 (PTR)	?	BAE93113.1
<i>LeNRT1.1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	NRT1 (PTR)	?	X92853.1
<i>LeNRT1.2</i>	<i>L. esculentum</i>	NRT1 (PTR)	?	X92852.1
<i>NpNRT1.2</i>	<i>N. plumbaginifolia</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	CAC00545.1
<i>OsNRT1.1</i>	<i>Oriza sativa</i>	NRT1 (PTR)	NO ₃ ⁻	AB008519.1
<i>PtNrt1-2</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	NRT1 (PTR)	?	EEE99463.1
<i>TaNRT1.1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	NRT1 (PTR)	?	AAT69243.1
<i>ZmNRT1.2</i>	<i>Zea mays</i>	NRT1 (PTR)	?	AAY40798.1

Tabla 7. Genes usados en la búsqueda de transportadores de nitrato de baja afinidad en *H. polymorpha*. Estos genes codifican transportadores, o putativos transportadores, de nitrato de baja afinidad en algas y plantas.

La secuencia 5'-AACATGC-3' con la que se inicia la traducción del gen *HpCHL1* se ajusta a la secuencia consenso 5'-(A/G)NNATG(A/G)-3' propuesta como señal de inicio de la traducción en levaduras (Kozak, 1981). El estudio de 500 pb la región promotora del gen *HpCHL1* a través de la base de datos SCPD (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>) mostró varios sitios de unión de diferentes factores transcripcionales (Figura 47) como Gcn4, Hsf1 y Adr1. La secuencia consenso TGAXTX a la cual se une el factor transcripcional Gcn4 está presente en cinco sitios en el promotor localizados en las posiciones -157, -282, -289, -304 y -432. En la levadura *S. cerevisiae*, Gcn4 es el principal activador transcripcional que determina la inducción de un gran número de genes implicados en la denominada Respuesta del Control General de Aminoácidos. Esta respuesta se desencadena por la carencia de un aminoácido, disparando la traducción del ARNm de Gcn4, lo que requiere de la acción de la quinasa Gcn2, activada por la acumulación de ARNt no cargados por el ayuno de aminoácidos. Gcn2 fosforila al factor de iniciación eIF2 α , disminuyendo los niveles de eIF2 α no fosforilado, siendo este un mecanismo de control traduccional altamente conservado en eucariotas (Arndt y Fink, 1986). El factor transcripcional Adr1 presenta dos sitios de unión en las posiciones -396 y -415 reconociendo en ambos casos la secuencia 5'-TCTCC-3'. En *S. cerevisiae*, la presencia de etanol en el medio de cultivo aumenta la síntesis de este factor transcripcional uniéndose al promotor de la alcohol deshidrogenasa (*ADH2*) activando su expresión (Denis y Young, 1983; Thukral *et al.*, 1992). El factor transcripcional Hsf1 regula la transcripción de genes en respuesta a estrés (Sorger y Pelham, 1987). La participación en la respuesta a choque térmico es la función mejor conocida de Hsf1, el cual se une a las repeticiones invertidas 5'-NGAAN-3' de los HSE (*Heat Shock Elements*) (Amin *et al.*, 1988). Este factor también regula la transcripción de cientos de genes dianas, incluyendo los genes implicados en el plegamiento de proteínas, la detoxificación, la generación de energía, el metabolismo de los hidratos de carbono y la organización de la pared celular (Hahn *et al.*, 2004). Además puede inducirse en respuesta a otros agentes que causan estrés como metales pesados, anoxia y estrés oxidativo (Chatterjee *et al.*, 2000); Lee *et al.*, 2000). En la secuencia del promotor *HpCHL1* aparece un

elemento de unión de este factor transcripcional en la posición -478. El análisis del promotor con la base de datos RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/>) mostró la unión de otros factores transcripcionales, además de los anteriormente obtenidos por la base SCPD, entre los que destacan los factores Gcn4 implicado en el metabolismo de los aminoácidos (Arndt y Fink, 1986; Hinnebusch y Natarajan, 2002); Gat1, Gln3, Dal80 y Gzf3, relacionados con el metabolismo del nitrógeno (Coffman *et al.*, 1996; Minehart y Magasanik, 1991; Cunningham y Cooper, 1991; Soussi-Boudekou *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2010); los factores transcripcionales asociados con la respuesta a diversos tipos de estrés como Hsf1, Msn4 (Stathopoulos y Cyert, 1997; Hahn *et al.*, 2004; Estamond y Nelson, 2006; Martínez-Pastor *et al.*, 1996) y Crz1, factor transcripcional implicado en la expresión de genes asociados con la respuesta a estrés salino en *S. cerevisiae* (Cyert *et al.*, 2003) y *H. polymorpha* así como en la transcripción de los genes sensibles a represión catabólica por nitrógeno en *H. polymorpha* (Rodríguez *et al.*, 2010); Sfp1 asociado con el control del tamaño celular (Xu y Norris, 1998; Jorgensen *et al.*, 2004); Stb4 cuya función se ha asociado con la regulación de la expresión de transportadores (Ward y Bussemaker, 2008) y Cup9, represor transcripcional del gen *PTR2* de *S. cerevisiae* (Xia *et al.*, 2008).

TCGTCCCTCGTAGTGGGTTGAGCGGCGGTGCAAGACAATCTTGGTCTCGTT AGCAGGAGCATCACCCAAC TCGCCGCCAG CTTCTGTTAGAACCAGAGCAA	- 451
GCCCTTCCGTTCTTCTTTGGACACTCTTTCCAGAA CTCCACA ATCTCGC CGGGAAGGCAAGAAGAAACCTGTGAGAAAGGTCTTAGAGGTGTTAGAGCG	- 401
TCTCGGAA ATCTTTGTTCT GAATTG CTCCAGATTTGAACAACCTCAACAGG AGAGCCTTTAGAAACAAGACTAACGAGGTCTAAACTTGTTGGAGTTGTCC	- 351
TAGC TCTCCAC TGATGTCACCCGTTCCGGCCTGACCATCCGGACACGGGA ATCGAGAGGT GACTACAGT GGGCAAGCCC GGACTGGTAGGCCTGTGCCCT	- 301
CAGGCGCTC TTTAGCCTC TGGCTCTAAAATTTGGGACAGTATCGACT GAC GTCCGCGAGAAATCGGAG GACCGAGAT TTTAAACCCTGTCATAGCTGACTG	- 251
TTGGAT CGTTTT GAATTCTGAATG TTAGTCCGCTTTGTTTGGCGTTCT G A AACCTAGCAAAC TAAGACTT ACAATCAGGCGAAACA AAACCGCAAGACT	- 201
CAC TTACGTCCTTATTTTCTGTGCTTGCG ATCCGCCCC CTTGTGCATTTT GT GAATGCAGAATAAAAGGACACGAACGCTAGGCG GGGGA ACACGTAAAG	- 151
GCTGCAACTCGGCCAATCTCGCGGCCCGAATAGCTGCTAATTCT TGAGT CG CGACGTTGAGCCGTTAGAGCGCCGGGCTTATCGACGATT TAAGACT CAGC	- 101
TCCATCGTATTCAAACCTCGTGTGCAGAG AAATTTTTTTTTTT TGCGTTCGATC AGGTAGCATAAGTTT GAGCACACGTCTCTT TA AAAA AA AAACGCAGCTAG	- 51
GGCGC ATTATCTCGAGAG GATAAG GCATCTTTCTCCTTCAACGTTCCGCC CCGCG TAATAGAG CTCTCTCTATTTCGTAGAAAGAGGAAGTTGCAAGGCGG	- 1

Figura 47. Lugares de unión de factores transcripcionales al promotor de *HpCHL1*. En rojo se muestran los sitios de unión de Gcn4 en las posiciones -157/-152; -282/-277; -289/-285; -304/-299 y -432/-427; en azul los de Adr1 en las posiciones -396/-390 y -415/-409; en cursiva y subrayado el de Hsf1 en la posición -478/-485; en subrayado se representan los sitios de unión de Gat1 en el sitio -33/-26 y -45/-38; en verde el de Gln3 en el sitio -31/-27 y -44/-40; en gris el de Dal80 en el lugar -32/-26 y -45/-39; el rectángulo negro marca los sitios de unión de Gzf3 en el sitio -31/-24 y -44/-37; en los rectángulos fucsias los sitios de Crz1 en las posiciones -580/-572; -341/-333; -221/-213; -283/275 y -212/-204; en el rectángulo naranja el de Msn4 en -165/-161; en amarillo el de Sfp1 en el sitio -60/-80; en rectángulo azul los de Stb4 en la posición -110/-104; -235/-229 y -449/-443 del promotor y en violeta los lugares de unión de Cup9 en las posiciones -340/-332; -253/-195; -207/-199 y -62/-54.

2.2. Chl1 de *H. polymorpha* pertenece a la familia NRT1 (PTR).

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica de *HpCHL1* desde la base de datos del genoma de *H. polymorpha* (Rheinbiotech, Alemania) obtuvimos la secuencia aminoacídica empleando la herramienta disponible en la base de datos ExPaSy (<http://web.expasy.org/translate/>). La proteína Chl1 de *H. polymorpha* está constituida por 573 aminoácidos y tiene una masa molecular teórica de 63,5 kDa. El análisis de posibles dominios conservados en Chl1 se llevó a cabo con la

herramienta InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/>), obteniendo el dominio PTR presente en las proteínas agrupadas dentro de la familia de transportadores NRT1 (PTR). Además de este dominio HpChl1 también presenta la secuencia FING (FYxxINxGSL) propia de este grupo de transportadores que suele estar situada en el cuarto o quinto dominio transmembrana, así como la secuencia conservada ExCERFxYYG presente en el primer dominio transmembrana (Figura 48).

HpCHL1	79	ELAERASYYG	88	HpCHL1	251	YYFFINFG	258
Sec. consenso		EXCERFXYYG		Sec. consenso		FYXXINXG	8
		* .** . ***				:* ** *	

Figura 48. Representación de las secuencias conservadas de los transportadores PTR. Los motivos conservados de la familia PTR están presente en HpChl1 y se ajusta prácticamente a dicha secuencia consenso. (*) aminoácidos idénticos; (:) sustitución conservativa; (.) sustitución semiconservativa.

Los miembros de la familia NRT1 (PTR) transportan una gran variedad de sustratos que contienen nitrógeno tales como aminoácidos, péptidos y nitrato (Williams y Miller, 2001). La mayor representación de genes que codifican putativos transportadores de esta familia se han identificado en plantas, siendo los ejemplos más representativos los hallados en *Arabidopsis* con un total de 53 genes y *Oryza* con 80 genes. Los miembros de esta familia también están presentes en bacterias, levaduras y animales aunque en menor número. La abundancia de genes *NRT1 (PTR)* en plantas superiores sugiere que esta familia podría presentar funciones asociadas al transporte de nitrato o incluso al transporte de compuestos aún no identificados (Tsay *et al.*, 2007). Sin embargo, no todos los transportadores NRT1 (PTR) de plantas son transportadores de nitrato. Así, la expresión heteróloga de AtPTR2, HvPTR1, AtPTR1 y AtPTR3 en oocitos de *Xenopus* o en levaduras ha determinado su función como transportadores de dipéptidos (Rentsch *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 2004; Song *et al.*, 1996; West *et al.*, 1998; Dietrich *et al.*, 2009; Karim *et al.*, 2007). En el resto de los organismos los transportadores NRT1 (PTR) caracterizados llevan a cabo el transporte de di/tripéptidos (Fei *et al.*, 1994; Hanting *et al.*, 1997; Leibach y Ganapathy, 1996; Adibi, 1997).

Resultados. Caracterización de Ch11

HpCHL1	IQRPLPPGS--TTGSVLDPTS--DQSAGALGLGLGVASFLTQMLSFLLAYITPLYGGYVAD	152
CaPTR2	IQRRIDPDSPHGWGAPPPGSP--DASAGALGKGLQAASALTNLLTFLAYVFPLIGGYLGD	155
DhPTR	VTNPLPEGS--GTGKLMPPGS----VNPALGLGVPTATAITTYTLTFVAYLVPLYAGYVAD	174
CnPTR	IKNPLPEGG--NGAGAVAPGAAGTNQSAGALGRGSVQSSACYNFVFLANVFPIMGGILAD	167
	: . : . . * : . .**** * :: : *:* : *:* . * :.*	
HpCHL1	TKYGKFKSVWVGVTIGFFAHMLLVAASLPFVIKIVWLSLLLTVVSIIGIGFSAGYIKPNL	212
CaPTR2	STIGRWKAIQWGVFFGFVAHLFFIFASIPQAIENANAGLGLCVIAIITLSAGSGLMKPNL	215
DhPTR	SQIGKFRAIWIGVICGFFAHILLVIAAIPAVIEGNA-IVPTAFGIITLAFGTGFIKPNL	233
CnPTR	TRWGRFKTVAIGTAVGAFAHILMVVVTIPQVLRRTGNG-LGPFLVSFYILSFAAGFIKPC	226
	: *::: . * . * .**::: . :.* . . : . . : . :.* :.* *	
HpCHL1	FPLLVDQYAVDGNLIKVLPTGERVIVDRDATLERMSLIYYFFINFGCFVAIFSSIIERAF	272
CaPTR2	LPLVLDQYPEERDMVKVLPPTGESIILDREKLSRITNVFYLAINGAFLQIATSYCERRV	275
DhPTR	LPLLLDQYPEESDVVKLLPSGEKVIDRQKSLERMVLFYWSVNLGALFPIPSVYIEQRI	293
CnPTR	ATLLCDQSPVKKPVITTTKTGERVILDPTVQRYLLIFYWCINVGFFFAIASSYSARFV	286
	. * : * . . . : . : ** : * : * : : . * : : * : * . . * : . .	
HpCHL1	GFWMTYGFTALVYSVLPIMLIYKPRHLSEPTGVSIFEEVILLKELFQSGWFSRMRHG	332
CaPTR2	GFWLAFVPMILYIIIVPIFLFIVKPKLKI-KPPQGVMTNVVKILAVLFSGNFIKRLWNG	334
DhPTR	GFWFAFFIPIIIYLIIPAVFWFVRPRLKK-EKLQSSVMVNTNKILKVSFRGNWIKRIRNN	352
CnPTR	GFWLAYLLPGIVYMLMPIVLVVCYKRLYKAPPQGSVTLAMKVLYLI IKKGGFVKMFKGG	346
	***::: . . :.* :.* : . : * : : : : : : : : : .	
HpCHL1	-QFWSIQIS-----AATQKLAPSVT---IEDLNTTVQSCAIFLYFIIFNLDGSG	377
CaPTR2	-TFWDHARPSHMEARGTIYYNSKKSAITWSDQWILDIKQTFDSCKIFLYYIIFNLDADSG	393
DhPTR	-TFWDYAAPTNMNARGEYYSAKKKPIITWTDQWVLDVKQIVNISKVFLYFVIFNLCADG	411
CnPTR	EEFWQTAKPSYILAKE----GSVDTSKIFWDDLFDVDEIRQSIACGVFALIPIFNLDAGG	402
	** . . : . . : : . . : : . . : * **** * . .	
HpCHL1	---IASIQINQAGSMRTSGIPNDMFQSFNPLAILIIPIQDYLLYPFLRKRRRLTFHPVHK	434
CaPTR2	---LGSVETSLIGAMKLDGVPNDLFFNNFNPLTIIILIPILEYGLYPLLNKFKIDFKPIWR	450
DhPTR	GTGATPALTAQSGSLTSDGTPNDIYSSFNPTIIFLIPILDYGIYPLLRWKIDFRPVLR	471
CnPTR	---IGSQENDMSTAMTLNNAENDVISNFNPLTIVATPIITYGLYPFFDKIGHPIKPMTR	459
	. : : . . *** : . *** : * . * * : * : : : : : : : .	
HpCHL1	ITLGFICISATGTLVGAYLQYLIYIRSECGWEGASECETV---APISAWWCSSLMFGLQATG	491
CaPTR2	ICFGFVVCFSFSQIAGFVLQKQVYEQSPCGYY-ATNCDSP---APITAWKASSLFILAAAG	506
DhPTR	ITFGFLAALSQVAAAVIQE IYNQIECGDH-ATECVEKGI VAPFSAVSVMPYILSAAS	530
CnPTR	MAIGFILGMANMIYGAVIQWKIYSISECGWY-ASTCDTV---TSISIWAQIPLYSLPAIG	515
	: : ** : . : . : * : * ** * : * : : : * : * * .	
HpCHL1	ECFATVTAYELAYTMSSPAMKSFVVALFLCSNAISSIVGEEIISFWAHDPNLYAIFMSCAL	551
CaPTR2	ECWAYTTAYELAYTRSPALKSLVYALFLVMSAFSAALSIAITPALKDPNLHWVFLAIGL	566
DhPTR	ECFANTSGYELGYTRAPPHLKGQVQALFLLATALAAAIGDAISPALKDPNLVWYFAALAI	590
CnPTR	EIFVNVTSYELAYTRAPARMKGLVYALCLFNQAISSAIGLACSNAIQDPYLIWPYVALAI	575
	****.** . . : * : * ** * * : : : . . : : ** * : : . .	
HpCHL1	LGYGFALVFLVQFKNLHKQLNN-----	573
CaPTR2	AGFLCAIVMLAQFWNLKWMENETNERERLDREEEEEANRGIHDVDHPIEAIVSIKS---	623
DhPTR	VGGVFTVLFFYVHFRNLHKIMGQESKLRAIMMRQENEKEVSEVNNLAS-ITVSPVAVKQI	649
CnPTR	ACLICAVLCPTYFRHLNDPVRTFADPARQAGKLQELPLTAARASQNELNEKADEKA---	632
	: : : . * : * . . :	

B	Similitud	Identidad	N° de residuos	Dominio PTR	GenBank
HpChl1	--	--	573	159-520	--
AtNRT1.1	51 %	12 %	590	99-505	AAA32770.1
AtPTR2-I	57 %	15 %	545	114-286/297-479	AAD20094.1
AtPTR2-II	56 %	16 %	568	109-499	AAB60766.1
AtPTR2-B	52 %	14 %	585	113-516	AAB00858.1
AtPTR2-III	51 %	12 %	583	96-488	AAL36253.1
BnNRT	48 %	13 %	588	98-503	CAC07206.1
GmNRT1-1	50 %	12 %	597	95-504	BAB19756.1
GmNRT1-2	46 %	12 %	605	103-512	AB052785.1
GmNRT1-3	52 %	9 %	574	102-502	BAB19758.1
HvPTR1	52 %	16 %	579	98-498	O48542
LjNOD65	54 %	13 %	574	95-492	AAB69642.1
NpNRT	50 %	11 %	590	100-508	CAC00544.1
OsNRT1	52 %	13 %	584	113-515	AAF07875.1
TaNRT1.2	54 %	12 %	586	116-516	AAT69243.1
ZmNRT1.2	49 %	14 %	522	55-446	AAAY40798.1

HpCHL1 345 KLAPSVTIEDLNTTVQSCAIFLYFIIIFNLNDGSIASIQINQAGSMRTS-- 392
 HvPTR1 315 RLCTVTQVEELKSVVRLLPiWASGIVFATVYQGMSTMFLVQGNLTLDASMG 364
 :*.....*:.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 393 ---GIPNDMFQSFNPLAILIIPIQDYLLYPFLRK---RRLTFHPVHKIT 436
 HvPTR1 365 PKFKIPASLSIFDTLSVIAWVVPYDRILVPAVRSVTGRPRGFTQLQRMG 414
 .**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 437 LGFCISATGTLVGAYLQYLIYIRSECGWEGASECETVAPISAWWCSLMFG 486
 HvPTR1 415 IGLVSMFAMLAAGVLE-LVRLRT-IAQHGLYGEKDVVPISIFWQVPQYF 462
 :*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 487 LQATGECFATVTAYELAYTMSSPAMKSFVVALFLCSNAISSIVGEII 533
 HvPTR1 463 IIGCAEVFTFVGQLEFFYDQAPDAMRSMCSALSLLTTVALGNLSTLL 509
 :.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 340 SAATQKLAPSVTIEDLNTTVQSCAIFLYFIIIFNLNDGSIASIQINQAGSM 389
 ZmNRT1.2 266 TASPWRLCTVSQVEELKTVLRMFPVWVSMVLFFAATAQMSSTFIEQGETM 315
 :*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 390 RTS----GIPNDMFQSFNPLAILIIPIQDYLLYPFLRK---RRLTFHPV 432
 ZmNRT1.2 316 DNRVGPFTVPPASLSTFDVISVMVCIPYDKALVPLARRATGKERGLSQL 365
 ... :*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 433 HKITLGFCISATGTLVGAYLQYLIYIRSECGWEGASECETVAPISAWWCS 482
 ZmNRT1.2 366 QRLGVGLALSVAGMVYAALLEARRLSLARAADGR-----PPMSIMWQA 409
 :.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

HpCHL1 483 LMFGLQATGECFATVTAYELAYTMSSPAMKSFVVAL 518
 ZmNRT1.2 410 PAFAVLGAGEVFATIGILEFFYDQSPDGMSLGTAL 445
 ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Figura 49. A. Alineamiento múltiple de Chl1 de *H. polymorpha* con proteínas de la familia NRT1 (PTR) de levaduras. Las secuencias de las proteínas se alinearon empleando la herramienta bioinformática ClustalW. Los dominios PTR, en color azul, fueron determinados por la aplicación InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/>). En los rectángulos se representan las secuencias conservadas. **B. Alineamientos locales de Chl1 con HvPTR1 y ZmNRT1.2 de plantas.** Los alineamientos se realizaron con el programa EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/). (*) aminoácidos idénticos; (:) sustitución conservativa; (.) sustitución semiconservativa.

El punto isoeléctrico teórico fue calculado con los programas Compute pI/Mw tool-ExpASY (<http://www.expasy.org/>), Gateway to Isoelectric Point Service de EMBL (<http://emblheidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>) y ABIM (http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/) obteniendo valores de 5.68, 5.6 y 5.54, respectivamente. El análisis de la secuencia peptídica a través del programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>), predice la localización de la proteína principalmente en la membrana plasmática (73,9 %) y en el retículo endoplasmático (17,4 %). La fusión de la proteína GFP al extremo C-terminal de Chl1 no ha aportado cepas con la construcción Chl1-GFP funcional. Tampoco ha sido posible obtener cepas portadoras de la fusión entre Chl1 y el epítipo HA. El perfil de hidrofobicidad de la proteína determinado con los programas OCTOPUS (<http://octopus.cbr.su.se/index.php>) y ExPaSy-TMpred (http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form.html) predicen que Chl1 está constituida por 12 dominios transmembrana (Figura 50), característica que comparte con otras proteínas de la MFS como PTR2 de *S. cerevisiae*, el transportador de di/tripéptidos identificado en esta levadura (Homann *et al.*, 2005), y NRT1.1 (CHL1) de *A. thaliana* (Huang *et al.*, 1996; Saier, 1994).

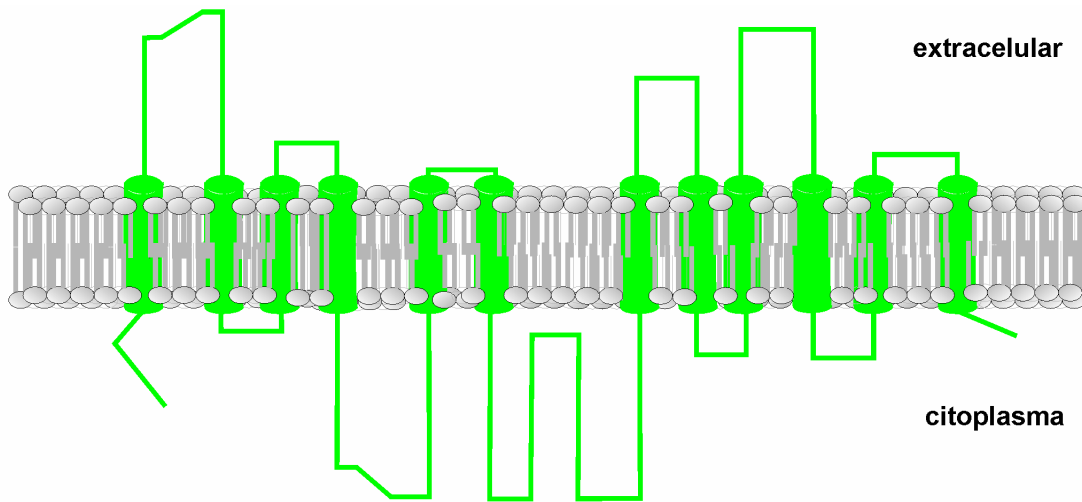


Figura 50. Esquema de la topología de la proteína Ch11 de *H. polymorpha*. El análisis bioinformático de la estructura secundaria de Ch11 predice doce regiones transmembrana en hélice α . El esquema es una adaptación del modelo obtenido con la aplicación informática TMRPres2D (<http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>).

Los transportadores de nitrato de la familia NRT1 y la proteína de la familia PTR comparten motivos conservados y una topología común, con doce segmentos transmembrana dispuestos en α -hélice (Paulsen y Skurray, 1994) lo que ha llevado a agruparlas en la familia NRT1 (PTR) (Tsay *et al.*, 2007). No obstante, existen diferencias entre las proteínas de la familia NRT1 (PTR), como es la secuencia consenso RXXT/S, responsable de la fosforilación del transportador NRT1.1 de *A. thaliana*, aunque dicha secuencia consenso no está presente en ninguno de los transportadores de la familia PTR identificados en animales y bacterias. Esto podría indicar que a pesar de tener homología de secuencia y compartir la misma estructura secundaria, la asimilación de nitrato de la familia NRT1 y la de péptidos de la familia PTR ha evolucionado por mecanismos diferentes. Así, los transportadores de nitrato no pueden transportar péptidos (Chiu *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000) y los transportadores de péptidos no transportan nitrato (Chiang *et al.*, 2004). El transportador de nitrato NRT1.1 de *A. thaliana* presenta cambios en su afinidad por el nitrato atendiendo al estado de fosforilación/desfosforilación del residuo de treonina en la posición 101 (T101), ejerciendo como un transportador de nitrato de alta afinidad en estado fosforilado y de baja afinidad en estado desfosforilado (Liu y Tsay, 2003). Sin embargo, no todos los transportadores de

nitrate de la familia NRT1 tienen esta afinidad dual por el nitrato. Un ejemplo es el transportador de expresión constitutiva AtNRT1:2, homólogo a AtNRT1 que transporta el nitrato con baja afinidad (Huang *et al.*, 1999). HpCh11, al igual que AtNRT1:2, carece de la secuencia de fosforilación RXXT/S en el sitio correspondiente a la T101 de AtNRT1.1, presentando en su lugar un residuo de ácido aspártico (D116). El análisis de los potenciales sitios de fosforilación de Ch11 se llevó a cabo con las aplicaciones informáticas NetPhos 2.0 Server, NetPhosYeast 1.0 Server (Figura 51) y NetPhosK 1.0 Server obteniendo múltiples sitios de fosforilación (Tabla 8).

NetPhos		
Posición	Secuencia	Prob.
7	TKQESLEPF	0.96
19	SDDSSLPKS	0.62
60	FEDSSLRKI	0.88
153	YVADTKYGK	0.92
155	ADTKYGKFK	0.87
243	DRDATLERM	0.62
248	LERMSLIYY	0.97
308	PTGVSI FEE	0.72
428	KRRLTFHPV	0.97
504	YELAYTMSS	0.86

NetPhosK		
Posición	Señal	Prob.
37	PKC	0.79
60	PKC	0.78
248	PKA	0.82
327	PKC	0.64
343	PKC	0.84
428	PKB	0.80
428	PKC	0.77
428	PKA	0.68
428	PKG	0.67

NetPhosYeast		
Posición	Secuencia	Prob.
15	FIEVSDDDSS	0.74
32	LSSISVVSNS	0.71
308	PTGVSI FEE	0.69
351	APSVTIEDL	0.65
508	YTMS SPAMK	0.89

Tabla 8. Principales residuos fosfoaceptores de Ch11 y posibles quinasas implicadas. NetPhosYeast 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/>) identifica los sitios específicos de fosforilación en levaduras. NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) identifica sitios genéricos de fosforilación teniendo en cuenta las correlaciones entre los residuos que rodean al posible residuo fosfoaceptor. NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) identifica sitios específicos de quinasas en proteínas eucariotas en base a conjuntos de sitios de fosforilación de S, T e Y validados experimentalmente. PKA, proteína quinasa dependiente de AMP cíclico; PKB, proteína quinasa B; PKC, proteína quinasa C; PKG, proteína quinasa dependiente de GMP cíclico.

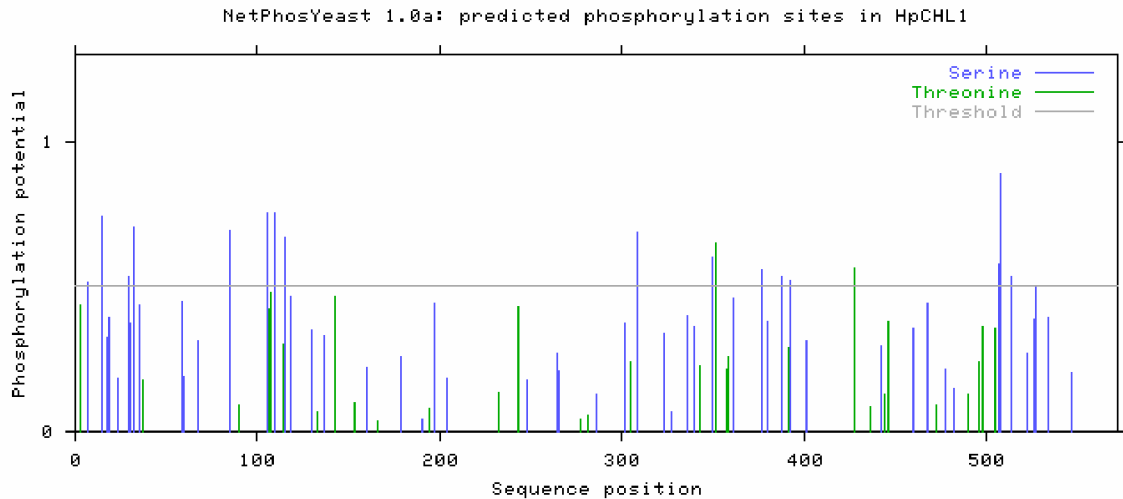


Figura 51. Distribución y probabilidad de putativos sitios de fosforilación de Nar1 según NetPhosYeast 1.0. Las barras verticales corresponden a los posibles residuos fosfoaceptores de Chl1 (S en azul y T en verde). La altura de la barra indica la puntuación que calcula el programa para cada residuo.

Los resultados derivados del análisis de la secuencia proteica de Chl1 indica que esta proteína se parece más a los transportadores de péptidos que a los transportadores de nitrato de la familia NRT1 (PTR).

2.3. HpChl1 no está implicada en el transporte de nitrato de baja afinidad.

Los estudios del sistema de nitrato de baja afinidad realizados en nuestro laboratorio han determinado ciertas características de dicho sistema de transporte. Entre otras, la levadura que carece de Ynt1 es capaz de crecer en 5 mM de nitrato, dando cuenta de la existencia de dicho sistema (Machín *et al.*, 2001). Por ello, con el fin de determinar el posible papel de Chl1 en el transporte de nitrato de baja afinidad fue necesario construir cepas carentes en los dos genes: *HpCHL1* y *HpYNT1*. Los resultados de crecimiento de $\Delta ynt1$ e $\Delta ynt1\Delta chl1$ en 1 y 5 mM de nitrato muestran que estas cepas son capaces de crecer por igual en nitrato (Figura 52 A), lo que sugiere que Chl1 no parece estar implicado en el transporte de nitrato de baja afinidad en esta levadura. La cepa $\Delta ynt1$ transporta menos nitrato en relación con la cepa silvestre, lo que se traduce en una menor tasa de excreción de nitrito al incubarla en presencia de

concentraciones micromolares de nitrato (Machín *et al.*, 2001). Por tanto, si Chl1 estuviera implicada en el transporte de nitrato de baja afinidad, la tasa de excreción de nitrito sería menor que en $\Delta ynt1$ al incubarla en presencia de concentraciones milimolares de nitrato. Sin embargo, las tasas de excreción de nitrito de $\Delta ynt1\Delta chl1$ en presencia de 10, 50 y 300 mM de nitrato son similares al control, $\Delta ynt1$ (Figura 52 B). De nuevo estos resultados indican que Chl1 no parece intervenir en el transporte de nitrato de baja afinidad.

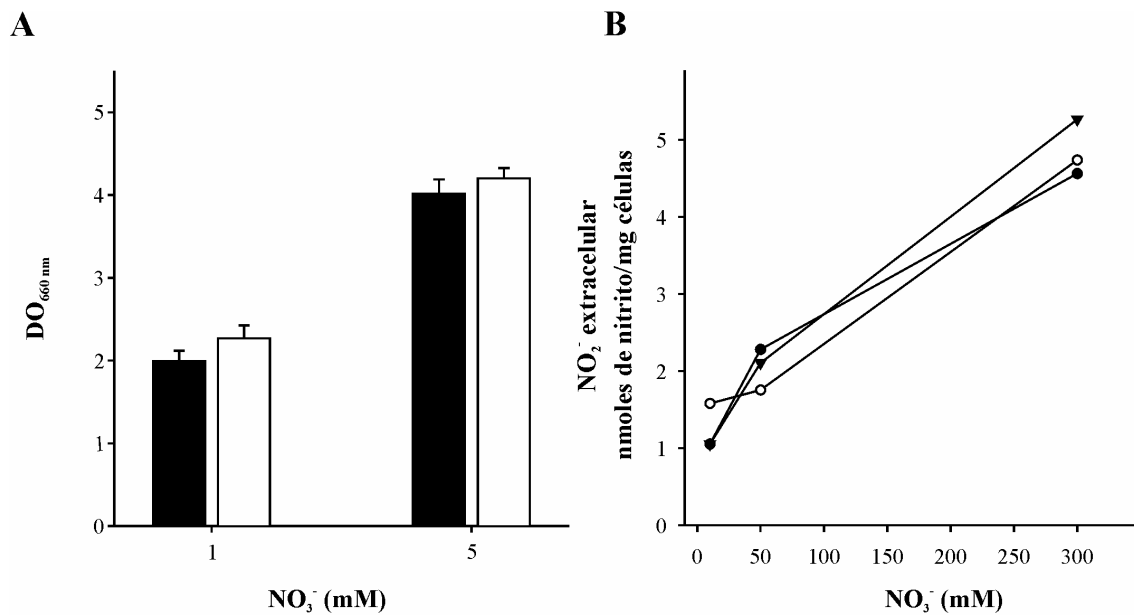


Figura 52. Chl1 no parece estar implicado en el transporte de nitrato de baja afinidad. A. $\Delta ynt1$ e $\Delta ynt1\Delta chl1$ crecen por igual en nitrato. Células crecidas en medio YG suplementado con nitrato a las concentraciones indicadas durante 40 h. El medio fue inoculado con una $DO_{660} = 0.15$ de las cepas $\Delta ynt1$ (columnas negras) e $\Delta ynt1\Delta chl1$ (columnas blancas). Los valores mostrados corresponden al valor medio de la densidad óptica alcanzada \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. **B. Excreción de nitrito.** Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml se lavaron y se resuspendieron en medio YG suplementado con 10, 50 y 300 mM de nitrato. Se muestra un experimento representativo de la excreción de nitrito a los 90 min de incubación de la cepa $\Delta ynt1$ (●) y de dos clones de $\Delta ynt1\Delta chl1$ (▼, △).

El sistema de transporte de baja afinidad de nitrato se caracteriza por ser constitutivo con respecto a la fuente de nitrógeno (Machín *et al.*, 2001), a diferencia del sistema de alta afinidad, mediado por Ynt1 (Ávila *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1997). Por tanto, el transporte de nitrato de baja afinidad ocurre en la levadura sin necesidad de someter a las células a un proceso de inducción previo en nitrato. Los resultados de crecimiento y excreción de nitrito de $\Delta ynt1\Delta chl1$

apuntan a que Chl1 no es el transportador de nitrato de baja afinidad, aunque desconocemos si realiza un transporte residual de nitrato en el rango de concentración milimolar. Por ello realizamos ensayos de consumo de 1 mM de nitrato durante intervalos largos obteniendo que $\Delta ynt1\Delta chl1$ es capaz de consumir nitrato al igual que la cepa $\Delta ynt1$ (Figura 53), por lo que Chl1 no parece transportar nitrato con baja afinidad.

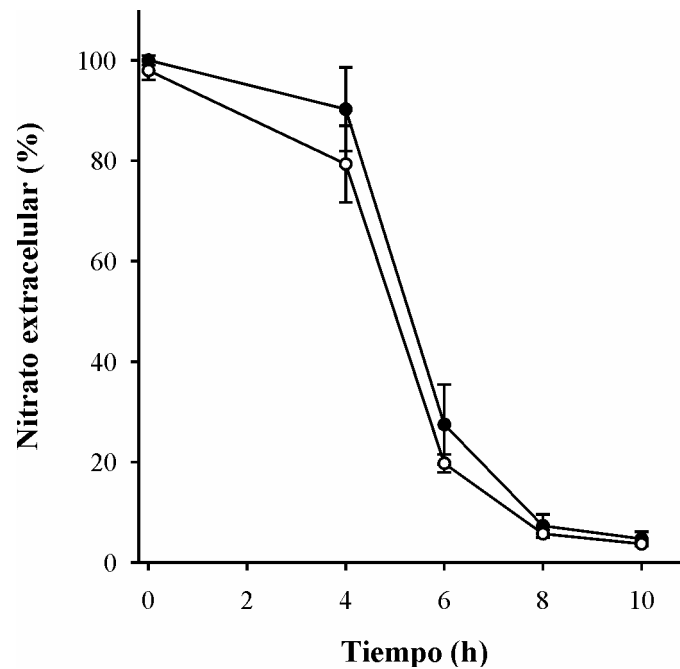


Figura 53. Consumo de nitrato de $\Delta ynt1$ e $\Delta ynt1\Delta chl1$. Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se lavaron y se resuspendieron a 20 mg de células/ml en medio YG conteniendo 1 mM de nitrato. A los tiempos indicados se determinó la desaparición de nitrato del medio de cultivo en las cepas $\Delta ynt1$ (●) e $\Delta ynt1\Delta chl1$ (○). Los resultados corresponden al valor medio \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes.

Otra aproximación que nos permite determinar si Chl1 está o no implicado en la asimilación de nitrato de baja afinidad se basa en medir la acumulación intracelular de este anión. Para ello se realizó la siguiente aproximación experimental: se llevó a cabo la delección de los genes *HpYNA1* y *HpYNR1* en $\Delta chl1$ obteniendo la cepa RG73 incapaz de expresar el gen *HpYNT1* comportándose, a efectos de asimilación de nitrato, como la cepa $\Delta ynt1$ (Figura 54 B). Como controles se usaron las cepas RG74, que comparte las delecciones de la cepa RG73 pero sobre un fondo genético $\Delta ssu2$, afectado en el sistema de excreción de nitrato (Cabrera, tesis doctoral, 2011); RG77 afectada en la

reducción del nitrato pero no en su transporte que ocurre a través de Ynt1; y FN3203 afectada en los genes *HpYNT1* y *HpYNR1* (Figura 54 A). La adición de nitrato al medio de cultivo provoca la acumulación de nitrato intracelular en todas las cepas por lo que el transportador de nitrato de baja afinidad permanece activo cuando se deletiona *HpCHL1*. La cepa RG77 acumula más nitrato que ninguna otra, ya que en esta cepa hay expresión de *HpYNT1*, seguida en orden decreciente por RG74, RG73, y FN3203 (Figura 54 C). La mayor concentración intracelular de nitrato en RG77 respecto de la obtenida en RG74 es debida a la ausencia del sistema de excreción de nitrato Ssu2.

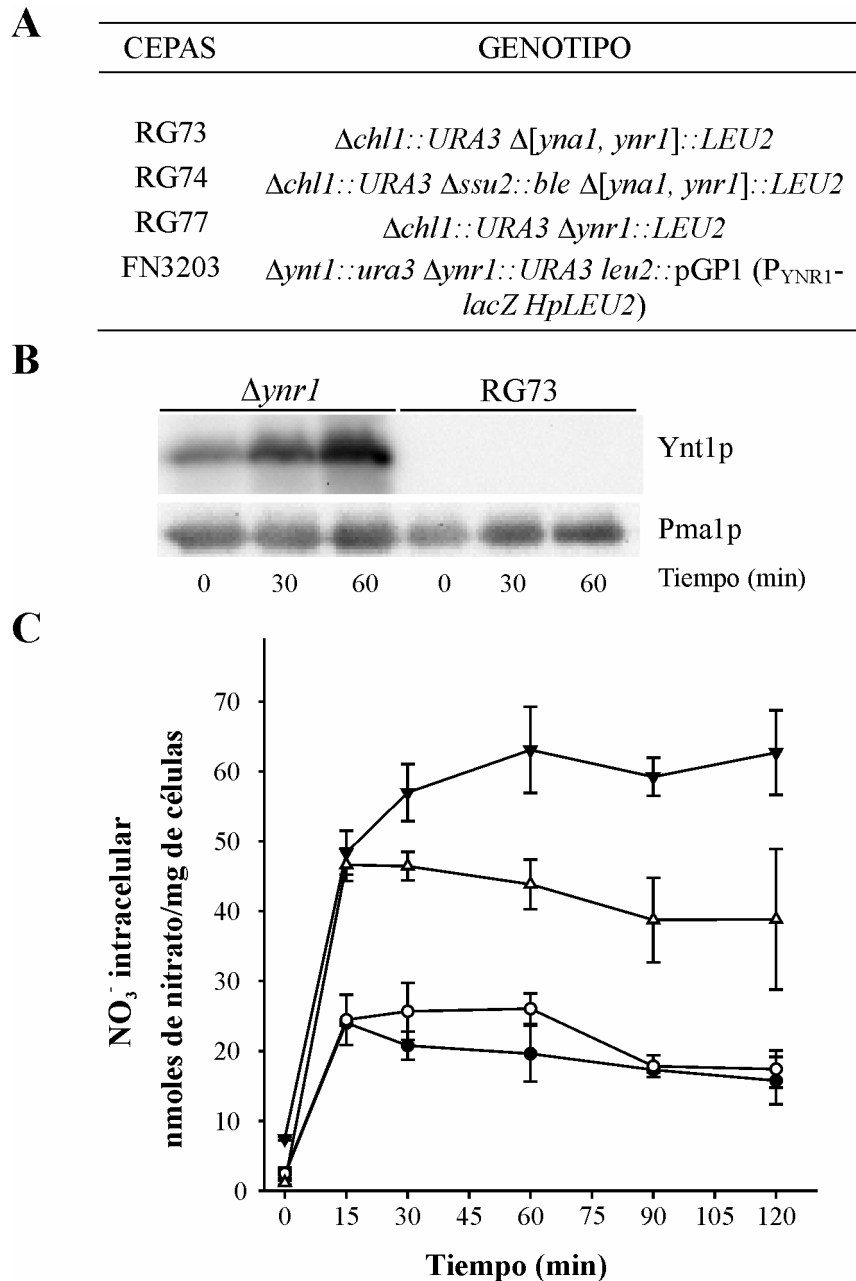


Figura 54. *Chl1* no está implicado en el transporte de nitrato. A. Cepas usadas en el estudio de la acumulación de nitrato intracelular. Las cepas RG73 y RG74 se obtuvieron de la recombinación homóloga con el fragmento derivado del plásmido pNJ4ALEU2, mientras que la cepa RG77 se obtuvo de la recombinación homóloga del fragmento obtenido a partir del plásmido pNR::LEU2. **B. Inmunoblot de *Ynt1* en la cepa RG73.** Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml, se lavaron y se resuspendieron en YG manteniéndolas en este medio durante 1.5 h. Al finalizar el ayuno de nitrógeno se adicionó al medio 5 mM de nitrato. A los tiempos indicados se tomaron muestras para realizar el inmunoblot de *Ynt1* en la cepa RG73 empleando como cepa control $\Delta ynr1$. **C. Acumulación de nitrato.** El procedimiento seguido es igual al del apartado B excepto que la concentración de nitrato adicionada fue de 15 mM de nitrato. Se representa el valor medio de la concentración intracelular \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. RG73 (○), RG74 (△), RG77 (▼) y FN3202 (●).

Los resultados nos muestran que Chl1 no participa en el transporte de nitrato de baja afinidad, ya que la acumulación de nitrato intracelular en la cepa RG73 alcanza concentraciones similares a las obtenidas en la cepa FN3203, y además son notablemente superiores cuando la salida de nitrato está afectada.

2.4. Caracterización de la cepa $\Delta chl1$.

2.4.1. $\Delta chl1$ crece bien en nitrato.

Según los resultados expuestos Chl1 no parece estar asociado con la entrada de nitrato de baja afinidad en *H. polymorpha*. Sin embargo, con el fin de conocer si existe una relación entre esta proteína y el metabolismo del nitrógeno se cuantificó la expresión relativa de *HpCHL1* mediante PCR a tiempo real y se llevó a cabo la búsqueda de fenotipos de la cepa $\Delta chl1$ tanto en medio sólido (Figura 55 A) como en medio líquido (Figura 55 B) en presencia de nitrato como fuente de nitrógeno. Los resultados de crecimiento no muestran diferencias apreciables entre la cepa mutante y la cepa silvestre en las condiciones analizadas. Por tanto, no parece existir una relación entre la función de la proteína Chl1 y el metabolismo del nitrato. Sin embargo, la expresión del gen se incrementó al incubar la cepa silvestre en 5 mM de nitrato durante dos horas, siendo tres veces superior en relación con la expresión que presenta en amonio (Figura 55 C).

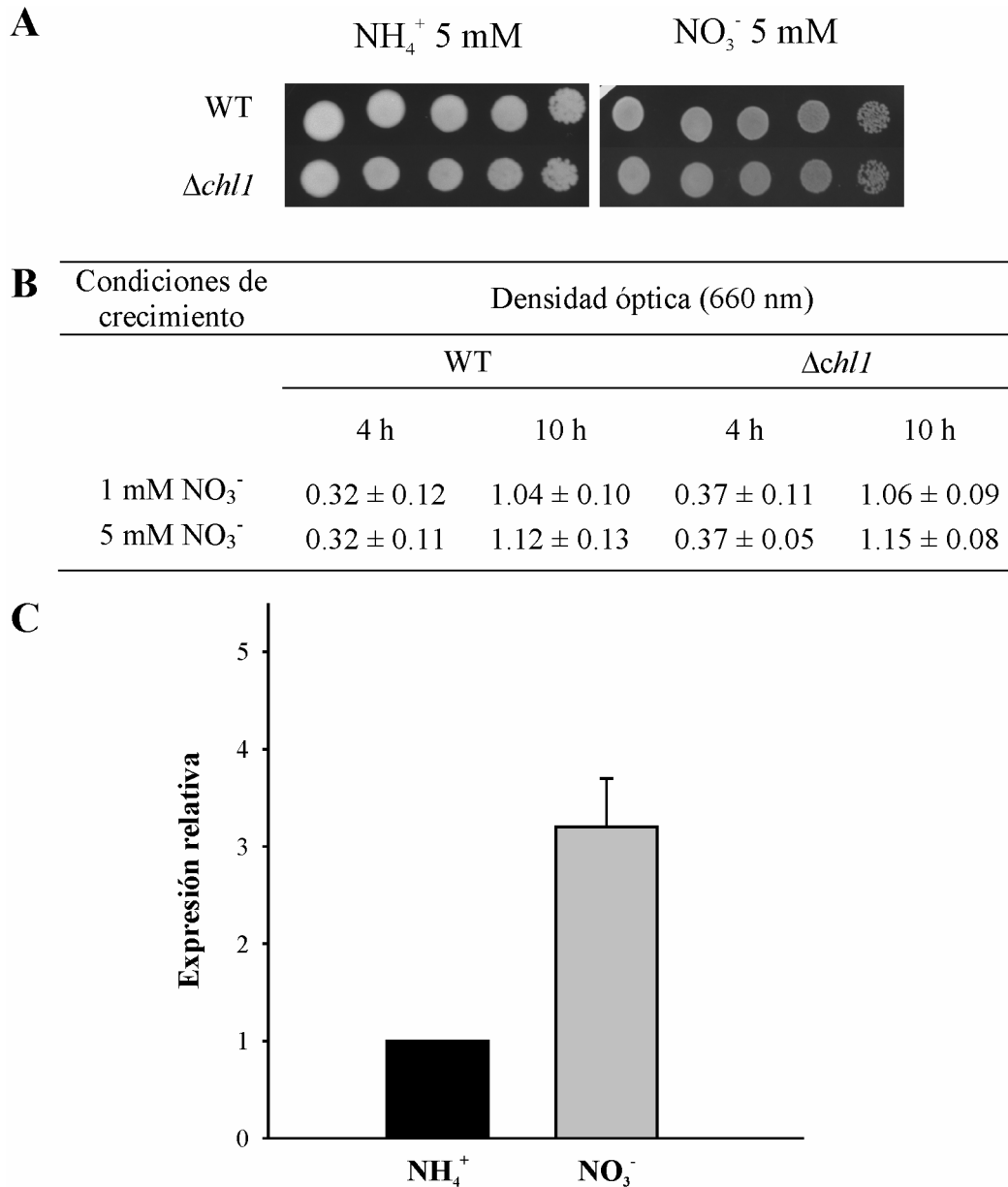


Figura 55. A. Crecimiento en medio sólido en presencia de nitrato y nitrito. Las cepas silvestre (WT) y $\Delta chl1$ se crecieron en medio YPD durante la noche, se lavaron con agua MilliQ estéril y se gotearon empleando diluciones seriadas sobre medio sintético suplementado con 5 mM de nitrato. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 días. **B. Densidad óptica en medio líquido en presencia de nitrato.** Las células se crecieron en medio YG suplementado con nitrato a las concentraciones indicadas y se inoculó con una $\text{DO}_{660} = 0.15$. Los valores corresponden al valor medio \pm desviación estándar de dos ensayos independientes. **C. Expresión relativa de *HpCHL1*.** Células crecidas en amonio hasta alcanzar 10 mg/ml, se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en medio YG suplementado con 5 mM de amonio (columna negra) o nitrato (columna gris). La expresión relativa se determinó a partir de las células incubadas durante 2 horas. Se representa el valor medio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

2.4.2. La mutación en *HpCHL1* reduce los valores de actividad nitrato reductasa e incrementa la excreción de nitrito.

Como hemos visto la delección de *HpCHL1* no impide que la levadura crezca en nitrato. Sin embargo, para conocer si la delección de *HpCHL1* afecta a la vía de asimilación de nitrato determinamos tanto la actividad nitrato reductasa en $\Delta chl1$ y en la cepa portadora de varias copias del gen, *nCHL1*, como la excreción de nitrito. Los resultados obtenidos muestran la reducción de la actividad nitrato reductasa en un 16 % en $\Delta chl1$ respecto a la cepa silvestre (Figura 56 A). Sin embargo, la tasa de excreción de nitrito en $\Delta chl1$, lejos de disminuir acorde con los valores de actividad nitrato reductasa, supera los valores obtenidos en la cepa silvestre (Figura 56 B). Resultados recientes de nuestro grupo indican que la expresión de la nitrito reductasa es reprimida por la acumulación de fuentes reducidas, derivadas de la reducción del nitrato, con el consiguiente incremento en la tasa de excreción de nitrito (Cabrera, tesis doctoral, 2011). Por otra parte, también se sabe que la actividad nitrato reductasa de *H. polymorpha* no está sujeta a regulación postranscripcional o postraducciona por fuentes de nitrógeno reducidas (Ávila *et al.*, 1998; Ávila *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2003), por lo que la acumulación intracelular de dichos nutrientes no provoca la pérdida de actividad, aunque sí afecta a la expresión del gen *HpYNRI* (Ávila *et al.*, 1998; Ávila *et al.*, 2002). Quizás la menor actividad nitrato reductasa observada en $\Delta chl1$ se deba a la represión de *HpYNRI* ejercida por la acumulación de alguna fuente nitrogenada reducida, como el amonio o los aminoácidos. Además, dicha acumulación explicaría el aumento de la tasa de excreción de nitrito como consecuencia de la inhibición de la actividad nitrito reductasa. Por otra parte, la cepa portadora de varias copias de *HpCHL1*, *nCHL1*, presenta valores de actividad nitrato reductasa similares a la cepa silvestre (Figura 56 A) aunque, a diferencia de ésta última, la tasa de excreción de nitrito es prácticamente nula (Figura 56 B). Por tanto, la sobreexpresión de *HpCHL1* devuelve a la levadura a los valores de actividad nitrato reductasa de la cepa silvestre, pero con una drástica reducción en la excreción de nitrito. Estos

resultados muestran la existencia de una relación entre la función de Chl1 y la asimilación de nitrato, indicando que Chl1 posiblemente actúe en el transporte de fuentes de nitrógeno reducidas ya que la cepa *nCHL1* parece derivar todo el nitrito hacia la obtención de dichas fuentes. Además, teniendo en cuenta que Chl1 se parece a los transportadores de péptidos de la familia NRT1 (PTR), posiblemente su función esté relacionada con este tipo de transporte. Por otra parte, Chl1 tan sólo comparte un 17 % de similitud con la proteína Aqr1 de *S. cerevisiae*, perteneciente a la familia de transportadores de resistencia a múltiples fármacos, implicada en la excreción de aminoácidos, a través de un mecanismo de antiporte de H^+ , cuando existen altas concentraciones de aminoácidos en el citosol (Velasco *et al.*, 2004). Dado el comportamiento en nitrato obtenido en $\Delta chl1$ y *nCHL1* podemos inferir que Chl1 posiblemente realiza el transporte de fuentes de nitrógeno reducidas hacia el exterior, aunque sin descartar que también esté implicada en el proceso de asimilación. Así, la pérdida total de excreción de nitrito de la cepa *nCHL1* podría deberse a un efecto sumidero del nitrito hacia la síntesis de compuestos nitrogenados reducidos que en determinadas circunstancias abandonan la célula por este putativo transportador de aminoácidos.

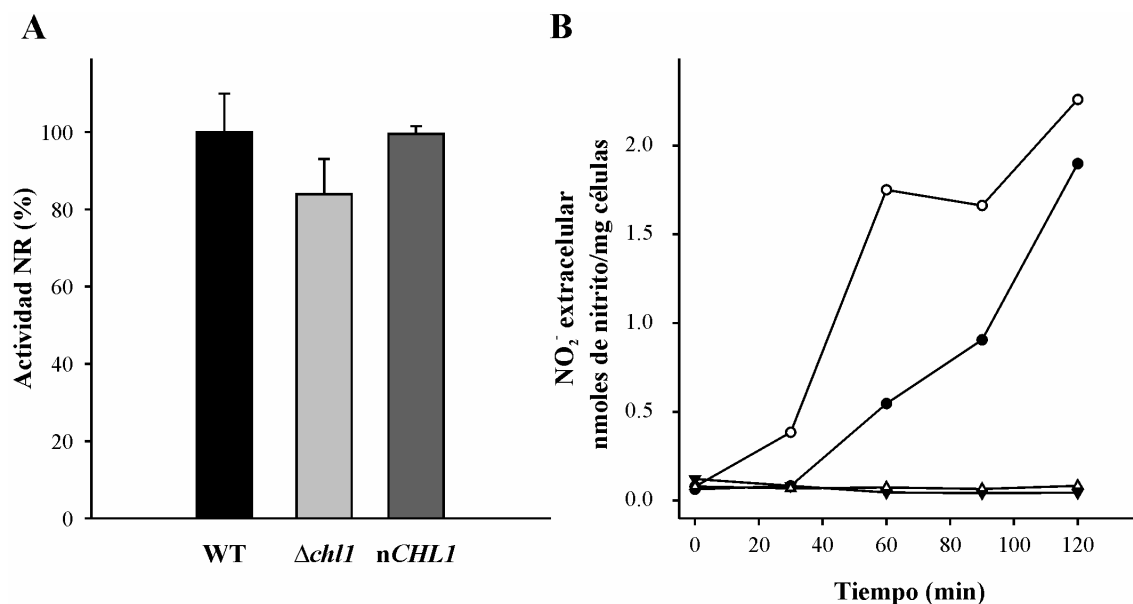


Figura 56. A. Actividad NR de la cepa silvestre, $\Delta chl1$ y *nCHL1*. Células crecidas en 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en medio YG en presencia de 5 mM de nitrato durante 2 horas. Las actividades específicas obtenidas a partir de

50 mg de células (peso fresco) fueron 29.2 ± 2.88 mU·mg proteínas⁻¹ en la cepa silvestre, 25.9 ± 2.66 mU·mg proteínas⁻¹ en $\Delta chl1$, y 28.9 ± 0.57 mU·mg proteínas⁻¹ en nCHL1. Se representa el valor de la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. **B. Cinética de excreción de nitrito.** El proceso de crecimiento e inducción es igual al descrito en el apartado A. El nitrito fue determinado en la cepa silvestre (●), $\Delta chl1$ (○) y en dos clones de la cepa nCHL1 (▼, △). Se representa un experimento representativo.

El comportamiento de la cepa $\Delta chl1$, en cuanto a su actividad nitrato reductasa y excreción de nitrito, es similar al descrito previamente en la cepa $\Delta ure2$ de *H. polymorpha*. En esta levadura Ure2 es un modulador negativo implicado en la represión catabólica del nitrógeno (RCN) y se asume que, al igual que en *S. cerevisiae*, secuestra a los factores transcripcionales Gln3, Gat1 y Gat2 en el citoplasma, impidiendo su entrada en el núcleo. Por tanto, la delección de *HpURE2* provoca la expresión de los genes sujetos a RCN mediada por los factores transcripcionales positivos. La determinación de la actividad nitrato reductasa de la cepa $\Delta ure2$ en 5mM de nitrato es aproximadamente un 80 % de la actividad de la cepa silvestre (Figura 57 A), con una tasa de excreción de nitrito superior (Figura 57 B). La actividad nitrato reductasa en $\Delta ure2$ en presencia de nitrato debería ser superior a la obtenida pues no opera la represión catabólica por nitrógeno, sin embargo, $\Delta ure2$ presenta bajos niveles de Gat1 por lo que la expresión de *HpYNR1* es menor (Rodríguez *et al.*, 2010). Debido a este paralelismo fenotípico entre $\Delta ure2$ y $\Delta chl1$ en relación con los valores de actividad nitrato reductasa y excreción de nitrito decidimos analizar si la delección de *HpCHL1* también afecta al patrón de desrepresión en presencia de fuentes preferidas de nitrógeno, tal y como se ha observado previamente en $\Delta ure2$ (Rodríguez *et al.*, 2010). Para ello, se cuantificó la actividad nitrato reductasa en presencia de 2.5 mM de nitrato y 5 mM de amonio. En estas condiciones la actividad nitrato reductasa de $\Delta chl1$ es considerablemente menor, obteniendo tan sólo el 17 % de la actividad mostrada por la cepa silvestre, mientras que $\Delta ure2$ ve incrementada su actividad en aproximadamente un 215 % (Figura 57 A). Por tanto, la delección de $\Delta chl1$ no supone la desrepresión de los genes sujetos a RCN, sino una mayor represión de los genes de la vía de asimilación de nitrato. Por otra parte, los valores de expresión génica de *HpYNR1* en la cepa $\Delta chl1$,

determinados mediante actividad β -galactosidasa, correlacionan con los obtenidos a partir de los ensayos de actividad nitrato reductasa. La expresión de *HpYNRI* inducida en 5 mM de nitrato se reduce en un 64 %, llegando al 82 % en presencia de 2.5 mM de nitrato y 1 mM de amonio (Figura 57 C). Este descenso en la actividad nitrato reductasa parece indicar un incremento en la concentración intracelular de fuentes de nitrógeno reducidas.

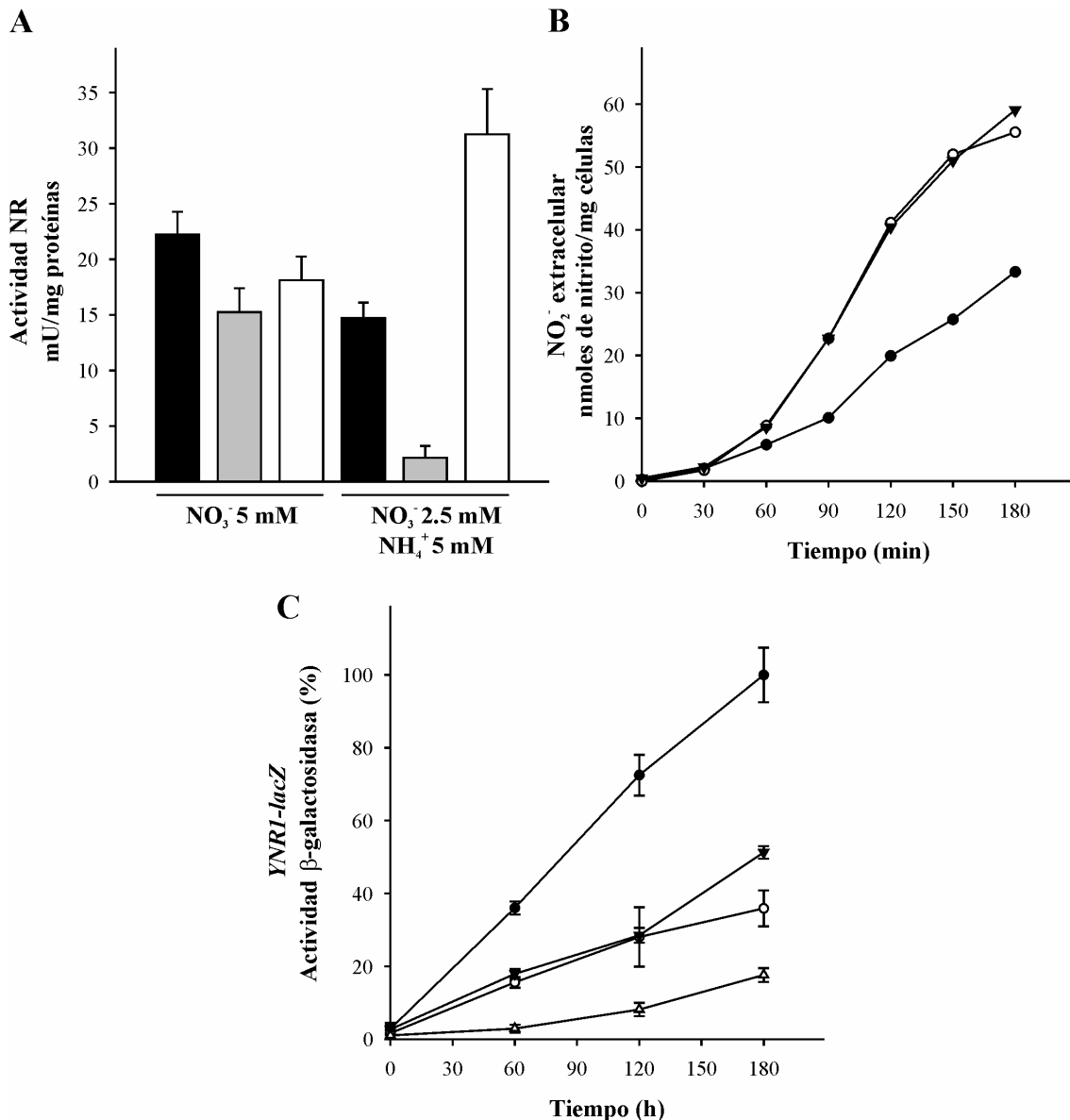


Figura 57. A. Actividad nitrato reductasa. Las células se crecieron en medio YGNH hasta 10 mg/ml, se lavaron y se resuspendieron en medio YG al que se adicionó nitrato 5 mM o 2.5 mM de nitrato y 5 mM de amonio. Las actividades se determinaron en 50 mg de células después de dos horas de incubación en la cepa silvestre (columna negra), $\Delta chlI$ (columna gris) y $\Delta ure2$ (columna blanca). Se representa el valor medio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. **B. Excreción de nitrito.** Se procedió como en el apartado A pero adicionando en este caso 50 mM de nitrato. Se muestra un ensayo representativo. Cepa silvestre (●), $\Delta chlI$

(○) y $\Delta ure2$ (▼). **C. Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre la expresión de *HpYNRI* en la cepa silvestre y $\Delta chl1$.** La expresión de *YNRI* se determinó mediante ensayos de actividad β -galactosidasa en la cepa silvestre y $\Delta chl1$ portadoras de la construcción *YNRI-lacZ* siguiendo la metodología descrita en el apartado A. Se representa el valor medio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. 5 mM de nitrato: cepa silvestre (●) y $\Delta chl1$ (○); 2.5 mM de nitrato + 5 mM de amonio: cepa silvestre (▼) y $\Delta chl1$ (△).

Las actividad nitrato reductasa y la excreción de nitrito, junto con los niveles de expresión de *HpYNRI*, son consistentes con la hipótesis de que Chl1 está implicado el transporte fuentes de nitrógeno reducidas hacia el medio extracelular. Así, la mayor acumulación intracelular de dichas fuentes en $\Delta chl1$ son las responsables de la menor expresión del gen de la nitrato reductasa en nitrato.

2.4.3. La delección y sobreexpresión de *HpCHL1* afectan al crecimiento en amonio.

El amonio es, junto con el glutamato, una de las fuentes de nitrógeno preferidas por *H. polymorpha*. Sin embargo se ha descrito que, al igual que ocurre con el nitrito, el exceso de amonio intracelular resulta tóxico para las levaduras (Hess *et al.*, 2006), bacterias (Müller *et al.*, 2006) plantas (von Wiren y Merrick, 2004) y mamíferos (Zwingmann y Leibfritz, 2005). Por tanto, las células deben de disponer de mecanismos de control implicados en la homeostasis del amonio con el fin de evitar la toxicidad derivada de su acumulación en el citoplasma. En el caso de *H. polymorpha* la concentración de amonio citosólico sería la resultante entre el transporte desde el medio de cultivo y hacia el exterior, el obtenido por la reducción del nitrato y el procedente del catabolismo de aminoácidos.

Si tal y como hemos propuesto Chl1 participa en la excreción de fuentes de nitrógeno reducidas, su delección generaría un incremento intracelular de aminoácidos y posiblemente del amonio, como precursor que es de éstos. Basándonos en esta hipótesis determinamos si la cepa $\Delta chl1$ y la portadora de varias copias de *HpCHL1* crecen normalmente en presencia de 5 mM de cloruro

de amonio (medio YGNH) o de 37.8 mM de sulfato amónico (medio YGAS), en medio sólido y líquido. Aunque el crecimiento de ambas cepas es similar al de la cepa silvestre en medio sólido (Figura 58 A), la cepa *nCHL1* se caracteriza por formar colonias de menor tamaño en medio YGNH si las comparamos con el tamaño que adquieren las colonias de la cepa silvestre y $\Delta chl1$, mientras que esta característica no se observa en medio rico (Figura 58 B). Sin embargo, es en el medio líquido donde se aprecian ciertas diferencias de crecimiento entre las cepas, siendo *nCHL1* la que muestra mayor incapacidad para crecer en las condiciones ensayadas (Figura 58 C).

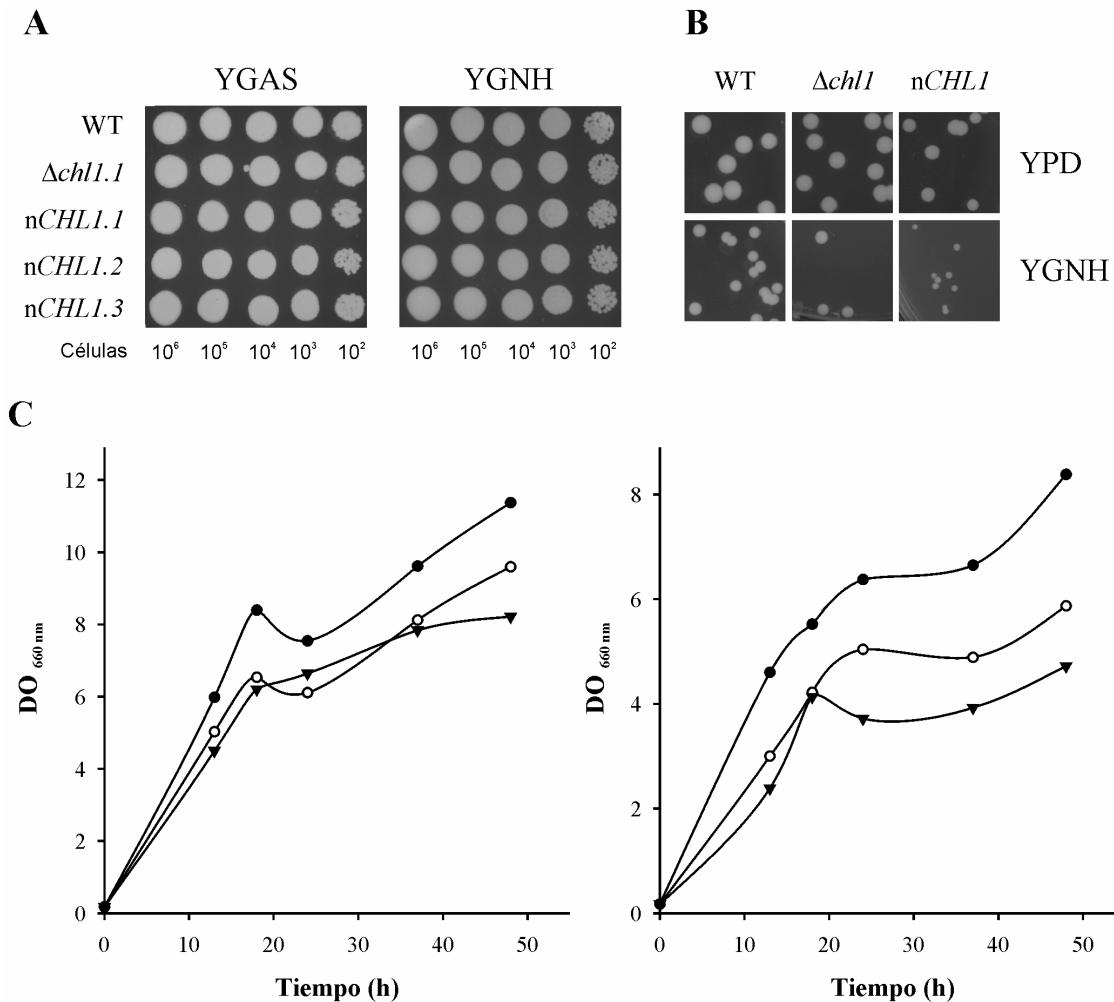


Figura 58. A. Crecimiento en medio sólido en presencia de amonio. La cepa silvestre (WT), $\Delta chl1$ y varios clones de *nCHL1* se crecieron en YPD durante la noche, se lavaron con agua MilliQ estéril y se gotearon en los medios indicados empleando diluciones seriadas. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 días. **B. Tamaño de las colonias en medio rico (YPD) y amonio (YGNH).** Se procedió como en el apartado A y se sembró 1 vol. de suspensión celular que contiene 10^2 células. **C. Densidad óptica en medio líquido en presencia de amonio.** Las células se crecieron en medio YGAS (izquierda) o medio YGNH (derecha) inoculando cada

cultivo con una DO inicial de 0.15. Cepa silvestre (●), $\Delta chl1$ (○) y nCHL1 (▼). En ambos casos se muestra un ensayo representativo.

Por tanto, la delección de *HpCHL1* y, en mayor medida, su sobreexpresión afecta al crecimiento de la levadura en amonio. El comportamiento de $\Delta chl1$ en este medio podría deberse al efecto tóxico derivado de la acumulación del amonio (Hess *et al.*, 2006) o de los aminoácidos (Vitiello *et al.*, 2007), mientras que en nCHL1 sería la excreción de estas fuentes, y en consecuencia su escasa disponibilidad, la responsable del menor crecimiento observado.

2.4.4. La delección en *HpCHL1* incrementa los niveles celulares de nitrógeno total.

Chl1 no guarda similitud de secuencia con las proteínas MEP responsables del transporte de amonio en *S. cerevisiae* (datos no mostrados) (Marini *et al.*, 1997). Sin embargo, el comportamiento en amonio de $\Delta chl1$ y, en mayor medida, el de la cepa nCHL1 nos ha llevado a plantearnos si existe una relación entre la función de Chl1 y el transporte de esta fuente nitrogenada en *H. polymorpha*. Para ello determinamos el consumo de amonio empleando como método cuantitativo el reactivo Nessler, el cual reacciona con el amoníaco, el amonio y algunos aminoácidos. Por tanto, la aproximación empleada nos da cuenta del nitrógeno presente en el medio de cultivo (considerado aquí como nitrógeno total) y no exclusivamente del amonio presente. Los resultados muestran cierta depleción del nitrógeno total en el medio de cultivo de la cepa silvestre desde los primeros minutos de la adición de amonio. En la cepa $\Delta chl1$ el nitrógeno total aumenta alcanzando el máximo a los 10 min de incubación, y a continuación disminuye alcanzando prácticamente los mismos valores que al inicio del consumo. Por tanto, la cepa mutante $\Delta chl1$ consume parte del nitrógeno presente en el medio. En relación con la cepa nCHL1 también se obtiene un incremento en el nitrógeno total desde los primeros 5 min permaneciendo constante durante el ensayo, sin que se produzca consumo

(Figura 59 A). Los resultados obtenidos en el consumo de amonio (nitrógeno total) en estas cepas correlacionan con los valores de nitrógeno intracelular, determinado a través de ensayos de acumulación de amonio durante intervalos largos de incubación. Así, en la cepa silvestre y aún más en $\Delta chl1$ aumenta la cantidad de nitrógeno intracelular mientras que en *nCHL1* permanece constante (Figura 59 B).

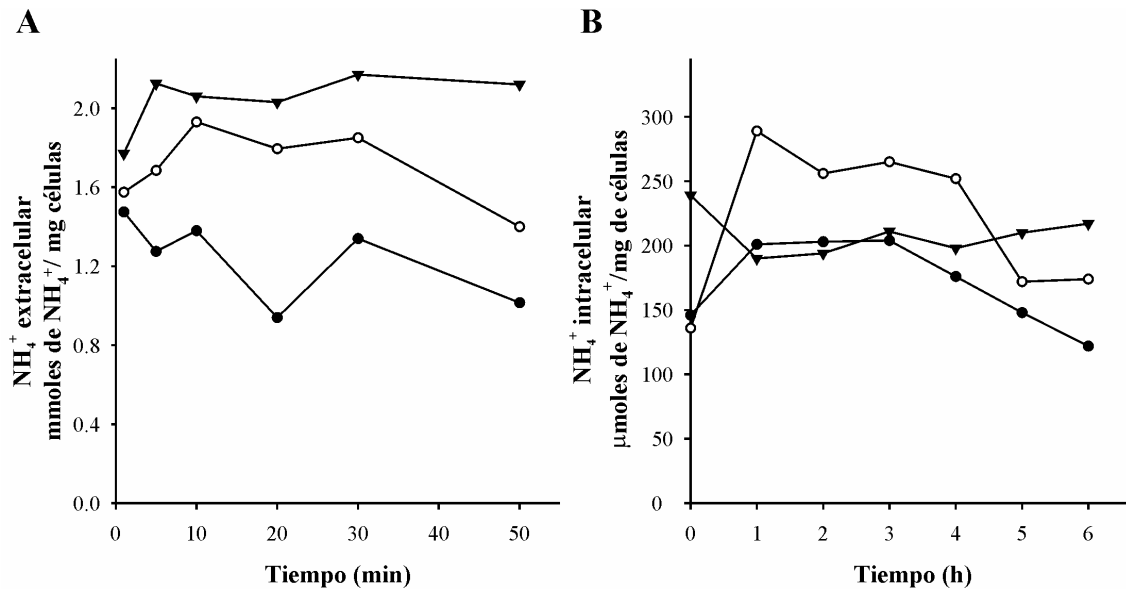


Figura 59. A. Consumo de amonio. Las células crecidas en medio YGNH hasta 20 mg/ml, se lavaron 2 veces con agua MilliQ y finalmente se resuspendieron en medio YG manteniéndolas en ayuno de nitrógeno durante 1 h. A continuación se adicionó al medio 0.6 mM de amonio. **B. Acumulación de amonio intracelular.** Las células se crecieron hasta 10 mg/ml, se lavaron 3 veces con agua MilliQ y se resuspendieron en YG manteniéndolas en ayuno de nitrógeno durante 2 h. A continuación se adicionó al medio 5 mM de amonio y se determinó el contenido de intracelular de nitrógeno a los tiempos indicados. En ambos casos se muestran experimentos representativos ensayados en la cepa silvestre (●), $\Delta chl1$ (○) y *nCHL1* (▼).

De esta forma, los resultados de consumo y acumulación de amonio indican que posiblemente *Chl1* esté implicada en la excreción de amonio y/o de aminoácidos. Si tal y como proponemos, *Chl1* realizara dicha excreción, la cantidad de *Ynt1* en $\Delta chl1$ incubada en nitrato debería ser inferior a la obtenida en la cepa silvestre. Además, dada la menor expresión de *HpYNR1* en $\Delta chl1$, es probable que la inducción del resto de los genes de la vía de asimilación de nitrato también esté disminuida en esta cepa. Los ensayos de inmunoblot muestran que *Ynt1* está presente en cantidades inferiores en $\Delta chl1$ y aún menores

en *nCHL1* respecto de las obtenidas en la cepa silvestre (Figura 60 A). Los niveles de Ynt1 obtenidos en *nCHL1* podrían deberse a una reducción en la síntesis general de proteínas por la excreción de aminoácidos que tiene lugar en esta cepa. Por otra parte, Ynt1 es estable en ausencia de nitrógeno, permaneciendo principalmente en estado fosforilado. Se ha propuesto que la fosforilación del transportador interviene en el direccionamiento y permanencia en la membrana plasmática (Navarro *et al.*, 2008). El estudio de la estabilidad de Ynt1 en un medio libre de nitrógeno muestra que el transportador es menos estable en $\Delta chl1$, acompañado de un menor grado de fosforilación dada la mayor acumulación de fuentes de nitrógeno reducidas (Figura 60 B). Estos resultados apoyan las observaciones previas obtenidas a partir del consumo y acumulación de amonio en $\Delta chl1$ y *nCHL1*.

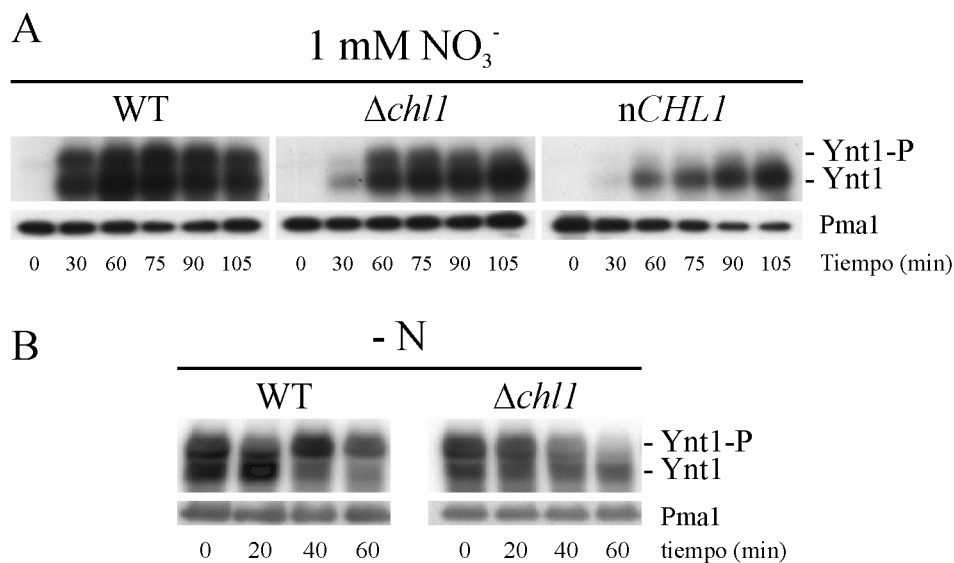


Figura 60. A. Inmunoblot de Ynt1 en la cepa silvestre, $\Delta chl1$ y *nCHL1*. Células crecidas en medio sintético con 5 mM de amonio hasta 10 mg/ml fueron lavadas y resuspendidas en medio YG al que se adicionó 1 mM de nitrato. A los tiempos indicados se tomaron muestras para realizar el inmunoblot de Ynt1. **B. Estabilidad de Ynt1.** Las células se crecieron en medio YGNH hasta 10 mg/ml y se resuspendieron, previo lavado, en medio YG al que se añadió 5 mM de nitrato, manteniéndolas en agitación durante 2 h. Finalmente se lavaron y se incubaron en medio YG retirando muestras del cultivo a los tiempos indicados.

En resumen, la cepa afectada en *HpCHL1* acumula algún tipo de fuente nitrogenada reducida, lo que lleva a esta cepa a consumir poco amonio; mientras, la sobreexpresión del gen hace que el transporte de amonio sea nulo. Así, una vez

en el citoplasma el amonio es transferido a los esqueletos carbonados para sintetizar aminoácidos que son excretados al medio. De esta forma el contenido intracelular de nitrógeno en *nCHL1* se mantiene constante limitando la síntesis de proteínas y, en consecuencia, su crecimiento.

2.4.5. La cepa $\Delta chl1$ es sensible al amonio y *nCHL1* excreta aminoácidos.

Hess y colaboradores han descrito que *S. bayanus* y tres cepas de *S. cerevisiae* excretan aminoácidos al medio de cultivo en respuesta al estrés producido por la toxicidad del amonio acumulado en las células en medios pobres de potasio. Esto se debe a un mayor transporte de los iones amonio al interior de la célula mediado por los canales de potasio (Hess *et al.*, 2006). Así, en condiciones de exceso de carbono y disponibilidad de otros nutrientes, el amonio que entra en la célula es más del que se puede incorporar a los aminoácidos, generándose un exceso intracelular del mismo que resulta tóxico. Por tanto, a bajas concentraciones de potasio la levadura es incapaz de crecer en amonio cuando esta es la única fuente de nitrógeno disponible. Nuestra hipótesis propone que Chl1 actúa como un transportador de aminoácidos, o incluso de amonio. Esto nos llevó a plantear si a *H. polymorpha* también le resulta tóxico el amonio en medios pobres en potasio. Dado que la concentración de potasio en el medio sintético (YG) es de 7.35 mM, siendo esta concentración probablemente superior a la presente en el medio ambiente, determinamos el comportamiento de la cepa $\Delta chl1$ y *nCHL1* en medios con amonio y bajas concentraciones de potasio. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones inferiores a 100 μ M de potasio impiden el crecimiento de estas cepas (Figura 61). En presencia de 100 μ M de potasio se observa que la cepa $\Delta chl1$ es sensible a la toxicidad del amonio (acumula amonio o aminoácidos), mientras que *nCHL1* crece en estas condiciones (excreta amonio o aminoácidos), al igual que la cepa silvestre. El incremento de la concentración de potasio en 10 veces evita el efecto tóxico del amonio en $\Delta chl1$. Por tanto, podemos concluir que la toxicidad a amonio en

medios con bajas concentraciones de potasio es una característica presente en algunas especies de *Saccharomyces* y en *H. polymorpha*. Además, la función de *Chl1* está relacionada con la respuesta celular frente a la toxicidad por amonio, bien porque transporta amonio directamente al medio o bien porque transporta aminoácidos, lo que confirma nuestra hipótesis inicial sobre la función de *Chl1* en el transporte de fuentes de nitrógeno reducidas hacia el medio extracelular.

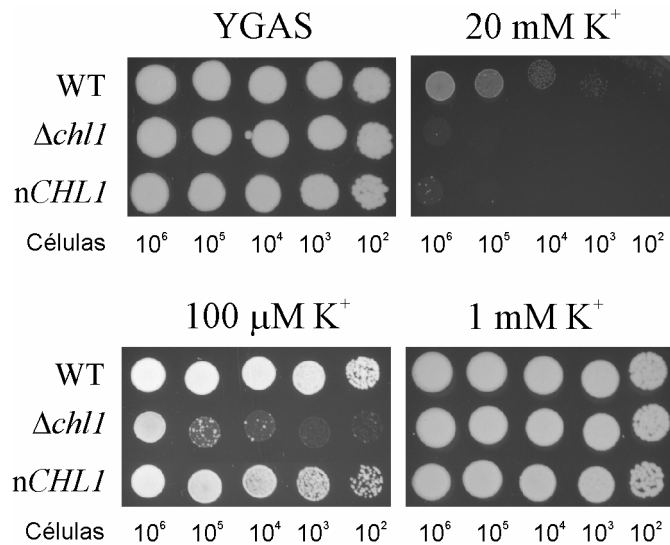


Figura 61. Concentraciones micromolares de potasio provocan toxicidad por amonio en *Δchl1*. Células crecidas en YPD durante la noche se lavaron con agua MilliQ estéril y se gotearon en los medios indicados empleando diluciones seriadas. Todos los medios de cultivo contienen 37.8 mM de sulfato amónico. El cloruro de potasio se adicionó a la concentración indicada en la figura y los medios fueron tamponados a pH 5.5 empleando 50 mM de MES-Tris. Las placas donde se gotearon la cepa silvestre (WT), *Δchl1* y *nCHL1* fueron incubadas a 37 °C durante 2 días.

Los mismos autores han propuesto que esta respuesta es un mecanismo conservado de detoxificación equivalente al presente en mamíferos, donde el exceso de amonio se elimina a través de la orina en forma de urea. Además, se ha descrito que la expresión constitutiva de los genes *MEP*, implicados en el transporte de amonio en *S. cerevisiae*, aumentan su entrada en la célula, reproduciendo tanto los efectos de la toxicidad del amonio como la excreción de aminoácidos (Hess *et al.*, 2006).

Con el fin de conocer si el bajo crecimiento de *nCHL1* en amonio (Figura 58 C), así como la tolerancia al amonio en medios pobres en potasio

(Figura 61) se debía a la excreción de aminoácidos, se determinó el perfil de aminoácidos en el medio de cultivo mediante la cromatografía líquida de alta resolución. Para ello se emplearon medios de cultivos sintéticos carentes tanto de fuentes de nitrógeno como de aminoácidos. Como se muestra en la Figura 62 A - izquierda-, el análisis de los filtrados del medio de cultivo revela la presencia de aminoácidos al transferir las células a medio fresco, principalmente por parte de la cepa $\Delta chl1$. La incubación de las cepas $\Delta chl1$ y $nCHL1$ en YGNH durante 180 min mostró un perfil de excreción de aminoácidos totalmente diferente siendo $nCHL1$ la que más aminoácidos excreta (Figura 62 A, -derecha-). Así, en este periodo de incubación detectamos una señal significativa para 12 de los 20 aminoácidos a partir de $nCHL1$, siendo principalmente la serina seguida de ácido aspártico, alanina y glicina los aminoácidos mayoritariamente excretados (Figura 62 B).

Estos resultados confirman que Chl1 está implicada en la excreción de aminoácidos, ya que la sobreexpresión de $HpCHL1$ genera un incremento en la cantidad de aminoácidos en el medio. Por otra parte, la cepa $\Delta chl1$ sólo excreta aminoácidos, aunque en concentraciones reducidas, una vez que el cultivo es transferido a un medio de cultivo fresco sin aminoácidos. Es posible que los aminoácidos detectados en esta etapa sean excretados de la célula a través de otros transportadores de aminoácidos o permeasas al incubar las células en un medio sin nitrógeno. Por otra parte, es probable que Chl1 intervenga en el transporte pasivo de aminoácidos actuando posiblemente como un transportador bidireccional que excreta aminoácidos bajo determinadas condiciones de crecimiento. Se ha sugerido que este comportamiento en el transporte sucede en los transportadores de aminoácidos regulados por el sistema SPS, tradicionalmente considerados como sistemas de entrada de aminoácidos. Sin embargo, se sabe que estos transportadores son pasivos y, por lo tanto, pueden ser bidireccionales. De hecho, existen evidencias que apoyan la capacidad que tienen estos transportadores para excretar aminoácidos: la adición de aspartato, un inductor del sistema SPS, lleva aparejada la excreción de un amplio espectro

de aminoácidos, mientras que el uso de la prolina, que no induce al sistema, no hace (Regenber *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2006).

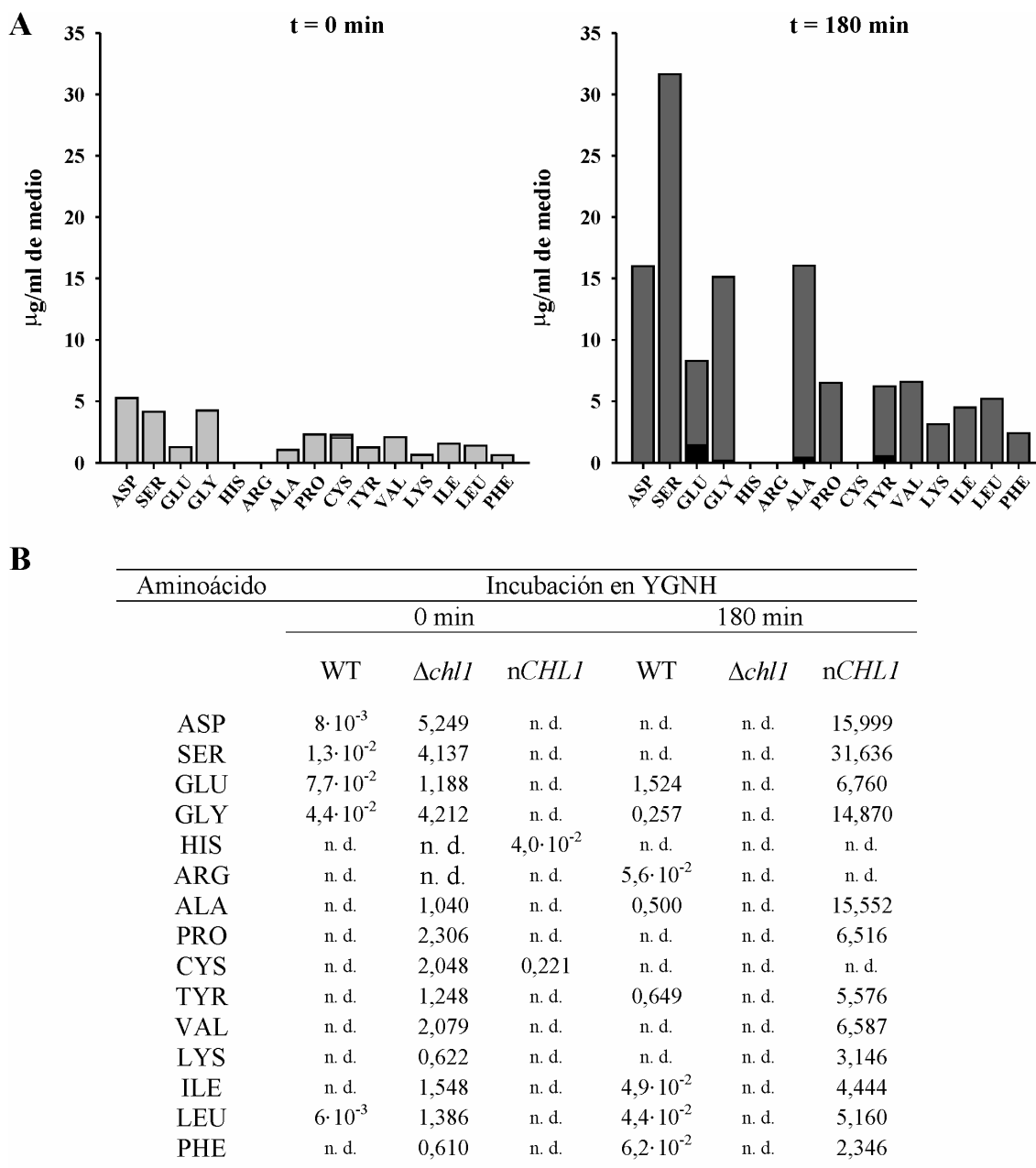


Figura 62. Determinación de aminoácidos mediante HPLC. A. Aminoácidos excretados al medio de cultivo. Células crecidas en medio YGNH hasta 10 mg/ml se lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en el mismo medio (izquierda) incubándolas durante 180 min (derecha). Cepa silvestre (columna negra), $\Delta chl1$ (columna gris claro) y nCHL1 (columna gris oscuro). **B. Perfil de aminoácidos excretados.** Los valores de aminoácidos detectados están expresados en $\mu\text{g/ml}$ de medio. Se representan los valores obtenidos a partir de un ensayo.

2.5. Estado de la vía de señalización de calcineurina en la cepa $\Delta chl1$.

2.5.1. Viabilidad celular de $\Delta chl1$ y *nCHL1* tras la exposición al frío.

Una característica que hemos observado al trabajar rutinariamente con $\Delta chl1$ y *nCHL1* es su menor crecimiento en amonio si se han expuesto a bajas temperaturas (4 °C) durante varios días. La viabilidad, determinada como el número de unidades formadoras de colonias en placas de YDP, disminuye considerablemente en la cepa $\Delta chl1$, si bien *nCHL1* es prácticamente igual de viable que la cepa silvestre (Figura 63). Además, hemos observado que las células de los cultivo de *nCHL1* muestran baja adherencia a la superficie de los recipientes empleados en las centrifugaciones y escasa compactación de las células sometidas a centrifugación. Estos fenotipos son similares a los que presenta la cepa $\Delta cnb1$ de *H. polymorpha*, afectada en la unidad reguladora de la calcineurina (Rodríguez, tesis doctoral, 2011). La coincidencia de fenotipos entre estas cepas junto con la presencia de un sitio de unión del factor transcripcional Crz1 en el promotor de *HpCHL1* nos llevó a estudiar el estado de la vía calcineurina en la cepa $\Delta chl1$.

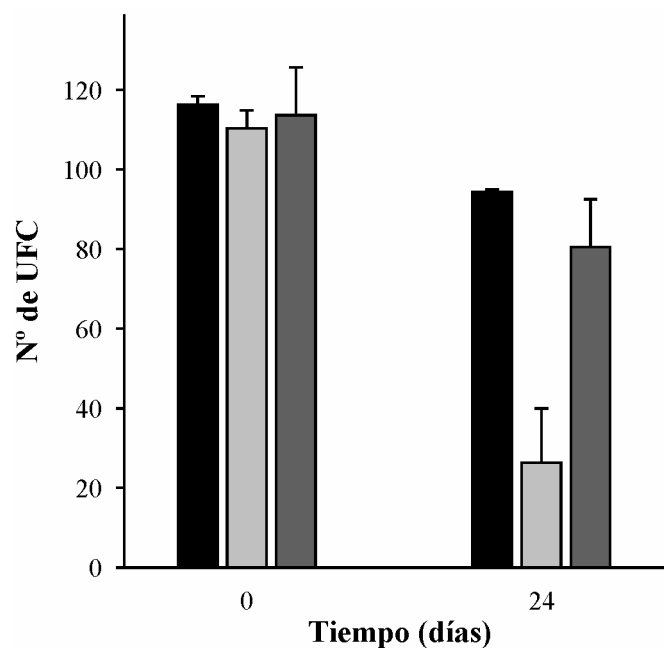


Figura 63. La exposición prolongada al frío afecta a la viabilidad celular de $\Delta chl1$. La cepa silvestre (columna negra), $\Delta chl1$ (columna gris claro) y $nCHL1$ (columna gris oscuro) fueron crecidas toda la noche en YPD y se guardaron a 4 °C durante más de 3 semanas. A los tiempos indicados se realizó la siembra de 10^2 células en placas de YPD, obteniendo el número de colonias después de 2 días de crecimiento a 37 °C. Se representa el valor medio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes.

2.6. Estado de la vía de señalización de calcineurina en la cepa $\Delta chl1$.

Estudios recientes de nuestro grupo han mostrado la conexión entre la regulación de los genes sujetos a RCN y la vía de señalización de la calcineurina (Rodríguez *et al.*, 2010). Esta proteína, con actividad fosfatasa, se activa al aumentar la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, tal y como sucede en condiciones de ayuno de nitrógeno o en presencia de fuentes no preferidas de nitrógeno, como el nitrato. En este ambiente se activarían los canales de calcio de la membrana plasmática y/o de los orgánulos donde se acumula el Ca^{2+} incrementando la concentración de Ca^{2+} citosólico, el cual activa en última instancia a la calcineurina. Esta proteína regula los niveles de expresión de los genes sujetos a RCN mediante la activación del factor transcripcional Crz1, regulando (entre otros) la expresión de dichos genes vía Gat1 (Figura 5). Así, en presencia de nitrato los genes de la vía de asimilación de nitrato se expresan gracias a la desrepresión ejercida por Gat1, controlado por la calcineurina-Crz1 (Rodríguez *et al.*, 2010), y a la inducción por nitrato.

Crz1 se une específicamente al elemento de respuesta dependiente de calcineurina (CDRE), secuencia que está presente en el promotor de los genes cuya expresión está regulada por calcineurina. Para comprobar el estado de activación de la vía calcineurina en $\Delta chl1$ se cuantificó mediante ensayos de actividad β -galactosidasa el nivel de expresión $4xCDRE-lacZ$ en la cepa silvestre y en $\Delta chl1$, portadoras de esta construcción. Los resultados obtenidos tras 4 horas de inducción en presencia de 0.7 M de NaCl, muestran que la expresión $4xCDRE-lacZ$ en $\Delta chl1$ es un 66 % inferior a la obtenida en la cepa silvestre. Además, en las condiciones ensayadas el incremento de la expresión $4xCDRE-$

lacZ en $\Delta chl1$ es del 17 %, mientras que la inducción en la cepa silvestre es prácticamente el doble, aumentando un 30 % (Figura 64). La menor expresión *4xCDRE-lacZ* en $\Delta chl1$ indica que existe menor activación de la calcineurina. Por otra parte, $\Delta chl1$ presenta marcada sensibilidad al macrólido FK506, inhibidor específico de la calcineurina (Parent *et al*, 1993), lo que correlaciona con una menor activación de la vía calcineurina.

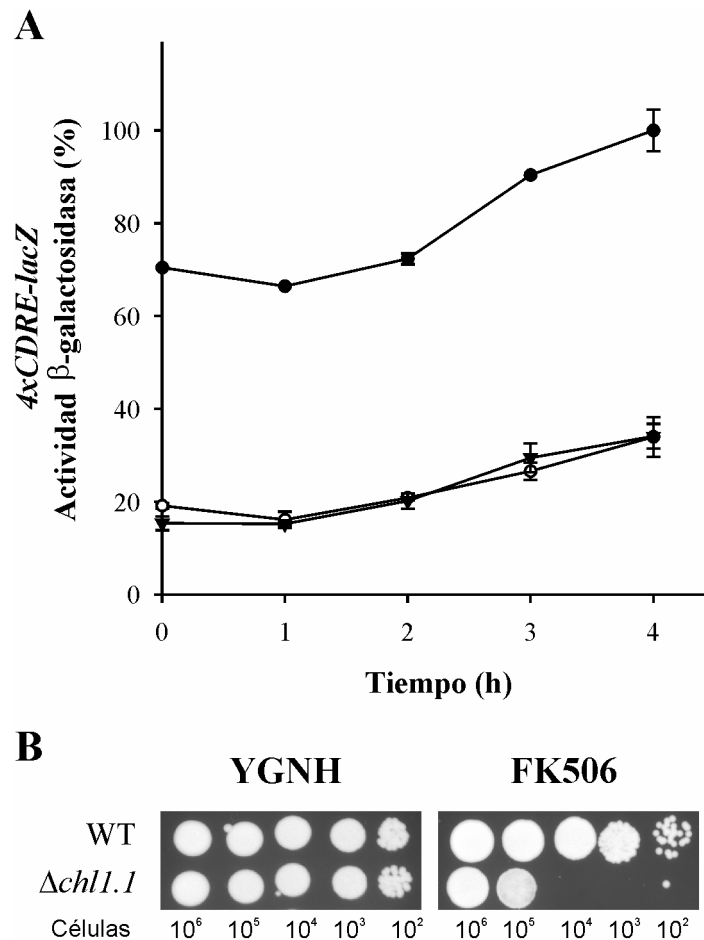


Figura 64. A. Efecto de la delección de *HpCHL1* sobre la expresión génica dependiente de calcineurina. La expresión se determinó mediante actividad β -galactosidasa en la cepa silvestre (●) y dos clones $\Delta chl1$ (○, ▼) que portan la construcción *4xCDRE-lacZ*. Células crecidas en amonio hasta 10 mg/ml fueron lavadas con agua MilliQ y transferidas al mismo medio al que se adicionó 0.7 M de NaCl manteniéndolas en agitación durante 4 h. Se representa el valor medio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. **B. $\Delta chl1$ es sensible a FK506.** Células crecidas en YPD durante la noche, se lavaron con agua MilliQ estéril y se realizaron diluciones seriadas para gotear en medio sintético con 5 mM de amonio y 25 μ g/ml de FK506. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 días.

En *H. polymorpha* la calcineurina también controla la expresión de otros genes como *HpENAI* vía Crz1 o bien a través de Gat1 (Rodríguez *et al.*, 2010).

Ena1 es una Na⁺-ATPasa de tipo P implicada en la detoxificación de Na⁺ y Li⁺ en *S. cerevisiae*, de tal forma que las células que carecen de esta proteína presentan un incremento drástico en su sensibilidad a estos cationes (Haro *et al.*, 1991). Nuestro grupo ha determinado que la expresión de *ENAI*, vía Crz1-Gat1, depende del grado de activación de la calcineurina. Así, $\Delta ure2$ (con bajo contenido en calcio) tiene una menor activación de calcineurina y, en consecuencia, la expresión de *ENAI-lacZ* también es baja, lo que se traduce en un fenotipo de sensibilidad a Li⁺ y Na⁺. Por tanto, visto que la menor activación de la calcineurina repercute sobre el estado de activación de Crz1, y en consecuencia de *ENAI*, determinamos su expresión en $\Delta chl1$. Los valores de expresión *ENAI-lacZ* obtenidos en $\Delta chl1$ son inferiores a los de la cepa silvestre, aunque mayores que en $\Delta ure2$, indicando que en $\Delta chl1$ la activación de la calcineurina es menor (Figura 65 A). Por otra parte, estos resultados se correlacionan con los valores de expresión de *YNR1-lacZ* obtenidos en $\Delta chl1$ (Figura 57 C), así como con los fenotipos de sensibilidad a Li⁺ y Na⁺ (Figura 65 B) derivados de la menor expresión de *HpENAI*.

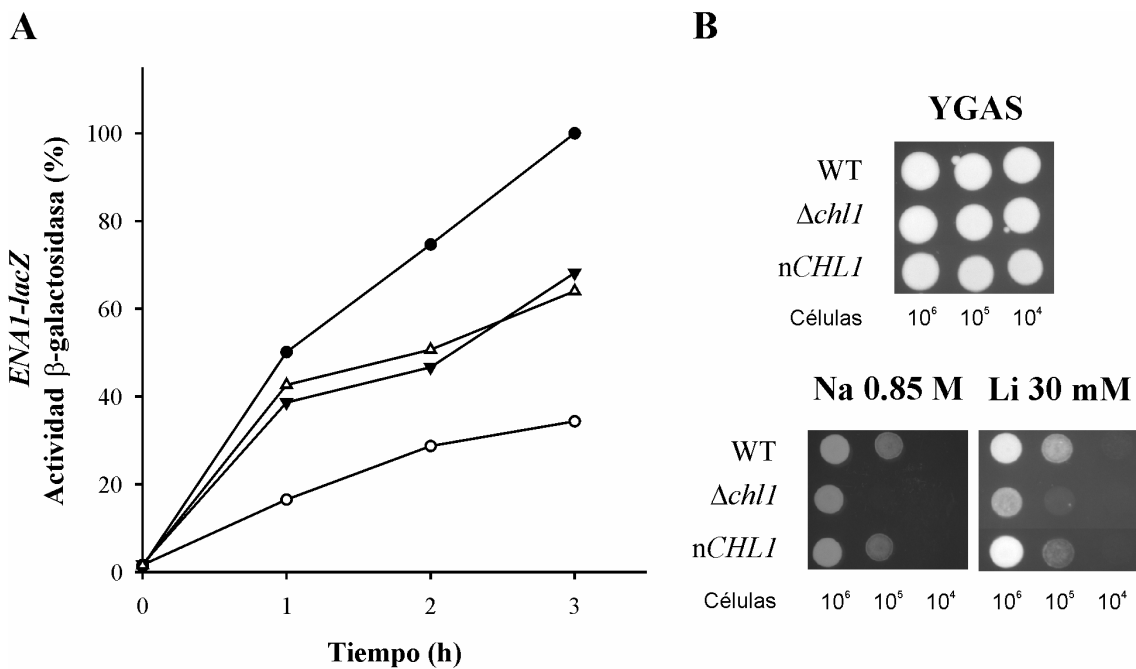


Figura 65. Expresión de *ENAI* en la cepa silvestre y $\Delta chl1$. La expresión de *ENAI* se determinó mediante ensayos de actividad β -galactosidasa en la cepa silvestre (●), $\Delta ure2$ (○) y en dos clones de $\Delta chl1$ (△, ▼) portadoras de la construcción *ENAI-lacZ*. Las células crecidas en medio con amonio hasta alcanzar 10 mg/ml lavaron con agua MilliQ y se resuspendieron en el

mismo medio, tamponado a pH 5.5 (50 mM de MES-Tris), al que se adicionó 0.7 M de NaCl. Se muestra un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados sin diferencias significativas. **B. *Δchl1* es sensible a Li⁺ y Na⁺.** Las células crecidas en YPD durante la noche se lavaron con agua MilliQ estéril y se realizaron diluciones seriadas para gotear en medio sintético tamponado a pH 5.5 (50 mM MES-Tris) al que se adicionó 30 mM de LiCl o 0.85 M de NaCl. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 días.

La deficiencia de calcineurina en *S. cerevisiae* lleva asociada la sensibilidad a Na⁺ y Li⁺, a Mn²⁺ así como defectos en la estructura de la pared (Rusnak y Mertz, 2000). Los mutantes calcineurina presentan una desregulación en la homeostasis del Mn²⁺ debida principalmente a la menor expresión de *PMRI* que codifica una bomba de Ca²⁺ del aparato de Golgi. Esta bomba secuestra el Mn²⁺ en los compartimentos tardíos de la vía de secreción (Matheos *et al.*, 1997). El Mn²⁺ también puede ser transportado a la vacuola por Vcx1p, un intercambiador Ca²⁺/H⁺ (Pozos *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha descrito que los mutantes calcineurina son sensibles a SDS ya que controla la expresión de genes implicados en la síntesis de la pared celular (*FKSI*, *MPKI* y *PKCI*) (Eng *et al.*, 1994; Garrett-Engle *et al.*, 1995; Parent *et al.*, 1993), de tal forma que la falta de expresión de dichos genes conlleva a defectos en la pared (Cyert, 2003). En nuestro grupo se ha caracterizado el fenotipo de la cepa *Δcnb1*, y al igual que en *S. cerevisiae*, presenta marcada sensibilidad a Na⁺, Mn²⁺ y SDS (Rodríguez *et al.*, 2010). Vista la menor activación de la calcineurina en *Δchl1* quisimos determinar si también existe un fenotipo asociado en Mn²⁺ y SDS. Los resultados obtenidos muestran que *Δchl1* tiene una marcada sensibilidad a SDS y una ligera restricción de crecimiento en presencia de MnCl₂ (Figura 66). Estos fenotipos de *Δchl1* muestran nuevamente que la delección de *HpCHL1* incrementa los niveles citoplasmáticos de amonio (y posiblemente de aminoácidos) lo que reduce la activación de la vía de calcineurina (Rodríguez, tesis doctoral, 2011), mimetizando la sensibilidad a cationes y SDS descrita en la cepa *Δcnb1* de *H. polymorpha* (Rodríguez *et al.*, 2010) y de *S. cerevisiae* (Rusnak y Mertz, 2000).

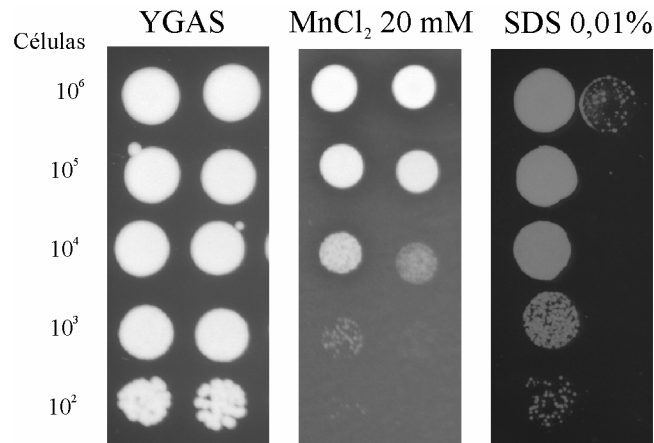


Figura 66. Sensibilidad de $\Delta chl1$ a $MnCl_2$ y SDS. Células crecidas en YPD durante la noche, se lavaron con agua MilliQ estéril y se gotearon diluciones seriadas de la cepa silvestre (derecha) y $\Delta chl1$ (izquierda) en medio sintético tamponado a pH 5.5 con $MnCl_2$ o en YPD con SDS. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días.

Dado que la activación de la calcineurina depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular, se estudió el papel de este catión en la cepa $\Delta chl1$. Los valores de Ca^{2+} intracelular en $\Delta chl1$ fueron similares a los obtenidos en la cepa silvestre y en *nCHL1*, siendo unas 2.5 veces inferiores a los obtenidos en la cepa $\Delta cnb1$, que carece de la subunidad reguladora de la calcineurina (Figura 67). Por otra parte, las cepas $\Delta chl1$ y *nCHL1* no mostraron diferencias de crecimiento en medio sólido en presencia de 0.4 M de cloruro de calcio (datos no mostrados). Estos resultados indican que la concentración de Ca^{2+} intracelular no varía sustancialmente ni en ausencia de *HpCHL1* ni cuando está sobreexpresado. Sin embargo, la menor activación de la calcineurina en $\Delta chl1$ podría deberse las oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} citosólico a tiempos cortos. Teniendo en cuenta que esta vía se activa principalmente en ausencia de fuentes de nitrógeno o en nitrato, la mayor acumulación de amonio intracelular en $\Delta chl1$ (Figura 59 B) podría disminuir la activación de la calcineurina.

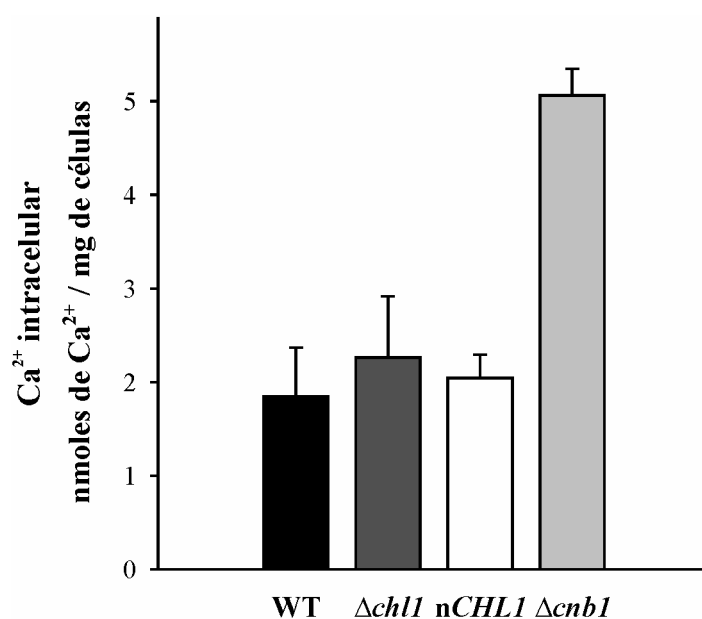


Figura 67. Contenido intracelular de calcio. Las células fueron crecidas en medio YGNH hasta una DO_{660} de 0.3. A continuación se recogieron por filtración y se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. Los valores se expresaron en nmol de Ca^{2+} ·mg de las células⁻¹. Se representan los valores medios \pm la desviación estándar de tres mediciones realizadas en dos experimentos independientes.

Discusión

La búsqueda bioinformática de posibles transportadores de nitrato de baja afinidad a partir de la base de datos del genoma de *H. polymorpha* aportó una ORF a la que denominamos *HpCHL1*. Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que Chl1 de *H. polymorpha* no participa en el transporte de nitrato de baja afinidad, sino que está implicada en el transporte hacia el exterior de la célula de fuentes de nitrógeno reducidas.

Chl1 de *H. polymorpha* presenta similitud de secuencia con las proteínas agrupadas dentro de la familia NRT1 (PTR), presente principalmente en eucariotas, entre los que se encuentran levaduras, plantas y mamíferos (Steiner *et al.*, 1995), y con un único representante identificado en procariotas (Hagting *et al.*, 1994). *HpChl1* tiene poca similitud con *AtNRT1.1* (*AtCHL1*), el transportador de nitrato de afinidad dual perteneciente a la subfamilia proteica IV de la familia NRT1 (PTR) (Steiner *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 2004). El hecho de que denomináramos esta ORF con el nombre de *HpCHL1* se debe a: i) El gen debía ser llamado con un nombre diferente al aportado por la base de datos cuyo uso era restringido, ii) El nombre *CHL1* indica que la proteína que codifica pertenece a familia NRT1 (PTR) así como la posibilidad de que dicho gen codificara un putativo transportador de nitrato. Esta familia está constituida principalmente por transportadores de péptidos, cuya asimilación constituye una fuente de carbono y/o nitrógeno para la mayoría de las especies de bacterias, hongos, plantas y animales. Todos los miembros de la familia NRT1 (PTR) transportan péptidos aunque con algunas excepciones como son *AtNRT1.1* que transporta nitrato (Tsay *et al.*, 1993), *CsNitr-L* que transporta nitrito desde el citoplasma hacia el estroma del cloroplasto (Sugiura *et al.*, 2007) y *BnNRT1;2* que transporta nitrato e histidina (Zhou *et al.*, 1998). Los sistemas de asimilación de péptidos mejor caracterizados son los de *Salmonella typhimurium* y *E. coli*, aunque estos sistemas de transporte pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC, cuyos integrantes se caracterizan por presentar cuatro

dominios asociados a la membrana: dos de ellos son hidrofóbicos y, en general, atraviesan seis veces la membrana y los otros dos dominios, localizados en la cara citoplasmática, contiene el casete de unión a ATP (Higgins, 1992). Sin embargo, los transportadores de péptidos de la familia NRT1 (PTR) no comparten las características distintivas con los transportadores de la superfamilia ABC. Chl1 no comparte similitud de secuencia ni con los transportadores de amonio, pertenecientes a la familia de proteínas Mep/Amt (Marini *et al.*, 1997), ni con Aqr1, un transportador implicado en la excreción de aminoácidos en *S. cerevisiae* (Velasco *et al.*, 2004).

Atendiendo a la familia a la que pertenece Chl1 y a los resultados obtenidos a partir de $\Delta chl1$ y nCHL1, su función está asociada al transporte hacia el exterior de fuentes de nitrógeno reducidas. La posible participación de Chl1 en el transporte de nitrato de baja afinidad analizada en $\Delta ynt1\Delta chl1$ mediante ensayos de crecimiento (Figura 52), consumo (Figura 53) y acumulación intracelular de nitrato (Figura 54 C) muestran que Chl1 no parece participar en la asimilación de nitrato al comportarse como $\Delta ynt1$. Aún así, Chl1 podría transportar nitrato con muy baja capacidad siendo indetectable en nuestros ensayos; sin embargo de ser así su repercusión es escasa o nula en la asimilación de nitrato. La expresión heteróloga de Chl1 permitiría analizar si realmente es un transportador de nitrato.

No obstante, el comportamiento de la cepa $\Delta chl1$ en nitrato establece la relación entre la función de Chl1 y la vía de asimilación de nitrato. Las evidencias que nos han permitido establecer dicha conexión han sido: i) reducción de la actividad nitrato reductasa con mayor tasa de excreción de nitrito en la cepa $\Delta chl1$ (Figura 56 B), ii) menor expresión de *HpYNR1* en nitrato (Figura 57 C) y, iii) mayor represión en amonio y nitrato (Figura 57 A). La cepa $\Delta chl1$ presenta características similares a la cepa que carece del regulador negativo Ure2 cuando ambas son incubadas en nitrato. Ambos mutantes presentan actividades reductasas en torno al 20 % y alta tasa de excreción de

nitrito. Sin embargo, en amonio y nitrato existe una clara diferencia entre ambas cepas: en $\Delta ure2$ se produce la desrepresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato (Rodríguez *et al.*, 2010), mientras que en $\Delta chl1$ el amonio ejerce su efecto represor (Figura 57 A). El hecho de que la actividad nitrato reductasa de $\Delta chl1$ sea menor en nitrato se debe a represión ejercida por la acumulación intracelular de fuentes de nitrógeno reducidas, afectando en consecuencia la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato. La acumulación de amonio (y/o de aminoácidos) que tiene lugar en $\Delta chl1$ reprime la expresión de *HpYNII*, el gen que codifica la nitrito reductasa, obteniendo una elevada tasa de excreción de nitrito (Figura 56 B). De hecho, esta acumulación intracelular de fuentes de nitrógeno reducidas en $\Delta chl1$ está de acuerdo con los menores niveles de Ynt1 observados en nitrato respecto de los obtenidos en la cepa silvestre (Figura 60 B), mostrando también menor estabilidad en ayuno de nitrógeno. Además, *nCHLI* tiene una actividad nitrato reductasa similar a la cepa silvestre y una excreción de nitrito prácticamente nula. En conjunto, estos resultados apoyan de nuevo que Chl1 no parece estar implicada en el transporte de nitrato.

Chl1 actúa como un sumidero de nitrógeno limitando los niveles citoplasmáticos de fuentes de nitrógeno reducidas. De hecho, el menor crecimiento de *nCHLI* y la formación de colonias de menor tamaño en amonio apoyan la participación de Chl1 en la excreción de compuestos nitrogenados reducidos (Figura 58). Además, la excreción de aminoácidos en $\Delta chl1$ es prácticamente nula y sólo se detectan pequeñas cantidades de aminoácidos al resuspender las células crecidas en amonio a un medio sin nitrógeno. Este comportamiento de $\Delta chl1$ podría deberse a un proceso de descarga de los aminoácidos acumulados en el citoplasma a través de sistemas de baja especificidad o incluso a través de transportadores de aminoácidos de expresión tardía así como a posibles defectos de la pared celular, como muestra el menor crecimiento en SDS. Asimismo, la acumulación de nitrógeno total en $\Delta chl1$ y el menor consumo de amonio (nitrógeno total) en *nCHLI* (Figura 59) se

correlacionan con los comportamientos de crecimiento y excreciones de aminoácidos observados en estas cepas.

Por otra parte, podría ser la propia acumulación intracelular de amonio la responsable del menor crecimiento de $\Delta chl1$ en medios pobres de potasio. La toxicidad por amonio es un proceso descrito tanto en plantas como en levaduras. Se han considerado diferentes procesos responsables de la toxicidad ejercida por el amonio: la salida de protones asociados a la entrada de amonio, las modificaciones del pH citosólico, la sustitución o reemplazo del amonio por cationes esenciales, tales como K^+ y Mg^{2+} , los cambios en el contenido de carbohidratos de la planta y el desacoplamiento de la fotofosforilación (Kronzucker *et al.*, 2001). En *A. thaliana* se ha descrito que los canales de potasio KAT1 presentan altas tasas de transporte de amonio (Schachtman *et al.*, 1992). El menor crecimiento de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en medios de cultivo pobres en potasio se debe a un incremento en el flujo de entrada de amonio, que resulta tóxico para la levadura. El amonio entra en la célula por los canales de potasio cuando la concentración de K^+ en el medio es baja. Así, en condiciones de bajo potasio y altas concentraciones de amonio, las células quedan expuestas a la toxicidad del amonio intracelular. Sin embargo, la levadura presenta un mecanismo de detoxificación basado en la excreción de grandes cantidades de aminoácidos al medio de cultivo, siempre que exista disponibilidad de fuentes de carbono y otros nutrientes (Hess *et al.*, 2006). Por tanto, la mayor sensibilidad de $\Delta chl1$ en medios con amonio y pobres en potasio sugiere que Chl1 está implicada en la detoxificación del amonio citosólico al transportar los aminoácidos hacia el medio extracelular. Las levaduras, al igual que los eucariotas superiores, evitan el efecto tóxico del amonio intracelular excretando compuestos ricos en nitrógeno como los aminoácidos.

La presencia de sitios de unión de los factores transcripcionales implicados en la represión catabólica por nitrógeno en el promotor de *HpCHL1* (Figura 47) indica que Chl1 está regulada por la calidad de las fuentes

nitrogenadas, como sucede con otras permeasas de aminoácidos (Didion *et al.*, 1998; Klasson *et al.*, 1999). De hecho la expresión de *HpCHL1* aumenta tres veces en nitrato respecto de la expresión que muestra en amonio, coincidiendo con la expresión de *HpGAP1* en las mismas condiciones de inducción (Rodríguez *et al.*, 2010), por lo que ambos genes se desreprimen en presencia de fuentes no preferidas. El hecho de que la expresión de Chl1 aumente en nitrato sugiere que la excreción de aminoácidos, además de la excreción de nitrato y nitrito, debe estar asegurada ya que el exceso de amonio en el citoplasma es tóxico. En *S. cerevisiae* la acumulación intracelular de amonio incrementa la excreción de aminoácidos a través de transportadores de aminoácidos regulados por el sistema SPS (Hess *et al.*, 2006). Estos transportadores son inducidos por niveles elevados de amonio intracelular, lo que facilita la excreción de aminoácidos, pudiendo ser posiblemente el único medio de detoxificación de amonio. En *S. cerevisiae* se desconocen los genes que codifican estos transportadores pero su expresión está controlada por el sistema sensor de aminoácidos SPS, implicado en la inducción de múltiples genes que codifican diferentes permeasas de aminoácidos (*AGP1*, *BAP2*, *BAP3*, *GNP1*, *VAP2* y *TAT2*) así como del transportador de péptidos (*PTR2*) (Didion *et al.*, 1998; Klasson *et al.*, 1999). En *H. polymorpha* hemos identificado que el gen *HpCHL1* codifica a un transportador implicado en la excreción de aminoácidos que podría ser inducido por el sistema SPS ya que de los 15 aminoácidos que detectamos a partir de los filtrados del medio no se encontró arginina, siendo éste el único aminoácido que no es sustrato de los transportadores del sistema SPS (Hess *et al.*, 2006).

Es posible que la vía TOR regule la actividad de Chl1, al igual que regula a otras permeasas como Gap1 y Tat2 en *S. cerevisiae* (Beck *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1998). Sin embargo, la cepa $\Delta chl1$ no muestra sensibilidad a rapamicina en las condiciones analizadas (6 μ M de rapamicina, datos no mostrados) lo que sugiere que la actividad de Chl1 es independiente de la vía TOR. Actualmente estamos inmersos en las determinaciones de los niveles de aminoácidos citoplasmáticos y extracelulares en $\Delta chl1$ y *nCHL1* incubadas en

rapamicina. Los diferentes perfiles de acumulación y excreción podrían aportar información sobre el posible grado de implicación de la vía TOR en la actividad de Chl1.

La acumulación de amonio intracelular en $\Delta chl1$ produce menor activación de la vía calcineurina. En *H. polymorpha* esta vía controla la expresión de los genes sujetos a RCN, así como la expresión de *ENAI*, la Na⁺-ATPasa de la membrana plasmática, en función de la calidad de las fuentes de nitrógeno (Rodríguez *et al.*, 2010). La activación de la calcineurina en esta levadura tiene lugar en ayuno de nitrógeno o en nitrato. En *S. cerevisiae* la activación de la vía implica un incremento en la concentración de calcio citosólico. En estas condiciones la calcineurina desfosforila al factor transcripcional Crz1, que entra en el núcleo uniéndose a los elementos de respuesta dependientes de calcineurina o CDRE. Esta secuencia está presente en el promotor de *HpENAI* y *HpGAT1*, el factor transcripcional positivo implicado en la desrepresión de los genes sujetos a RCN. Por tanto, la activación de la vía calcineurina en *H. polymorpha* da lugar a la expresión de *HpENAI*, mediada por los factores transcripcionales Crz1 y Gat1, así como de los genes de la asimilación de nitrato vía Gat1 (Rodríguez *et al.*, 2010). La menor activación de la vía calcineurina en $\Delta chl1$ está de acuerdo tanto con el incremento intracelular de fuentes reducidas derivadas de la incapacidad de la célula para detoxificar el amonio como con la menor expresión de *HpYNRI* en presencia de nitrato. La baja activación de la vía calcineurina en la cepa $\Delta chl1$ también se hace patente a partir de los resultados de expresión obtenidos de *CDRE-lacZ* y *ENAI-lacZ*, así como los fenotipos de menor viabilidad en frío, daños de la pared celular y sensibilidad a sales.

Desconocemos el estado de activación de la vía calcineurina en nCHL1, aunque los resultados de los que disponemos indican que son similares a los obtenidos en una cepa silvestre, al menos durante las primeras horas de incubación en nitrato, ya que ambas cepas comparten los mismos valores de

actividad nitrato reductasa así como la misma tolerancia a sales. Por tanto, es probable que la vía calcineurina no esté sustancialmente afectada en *nCHL1*. Por otra parte, los niveles de Ynt1 obtenidos en *nCHL1* son inferiores a los obtenidos en la cepa silvestre e incluso en la cepa $\Delta chl1$. Este hecho responde a la diferente regulación postraduccional a la que se encuentran sometidos los genes de la vía de asimilación de nitrato. Así, Ynt1 es ubiquitinado y degradado en la vacuola en presencia de fuentes de nitrógeno preferentes, como la glutamina (Navarro *et al.*, 2006) mientras que Ynr1 no está afectada por la calidad de la fuente nitrogenada (Ávila *et al.*, 1998; Ávila *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2003). Por tanto, tras la reducción del nitrato se obtienen los aminoácidos que escapan de la célula a través de Chl1. La presencia de aminoácidos en el medio ejercería el mismo efecto sobre Ynt1 que el observado en glutamina o en amonio. Además, y al igual que en la cepa $\Delta chl1$, Ynt1 está mayoritariamente desfosforilado siendo este comportamiento similar al obtenido cuando, en presencia de nitrato, se adiciona amonio o glutamina (Navarro *et al.*, 2008).

En resumen, el transporte de fuentes no preferidas como el nitrato o de fuentes preferidas como el amonio incrementan los niveles intracelulares de compuestos de nitrógeno reducidos. El amonio transportado desde el medio extracelular o el sintetizado a partir del nitrato se incorpora a los esqueletos carbonados para la síntesis de los aminoácidos. Cuando los niveles de amonio intracelular son elevados (por ejemplo, en condiciones de bajo potasio y elevado amonio) se produce la detoxificación de las fuentes reducidas mediante la excreción de aminoácidos a través de Chl1. De hecho, la cepa $\Delta chl1$ en nitrato presenta una excreción de nitrito elevada debida a la acumulación intracelular de fuentes reducidas que regulan negativamente el gen de la nitrito reductasa (Cabrera, tesis doctoral, 2011) (Figura 68).

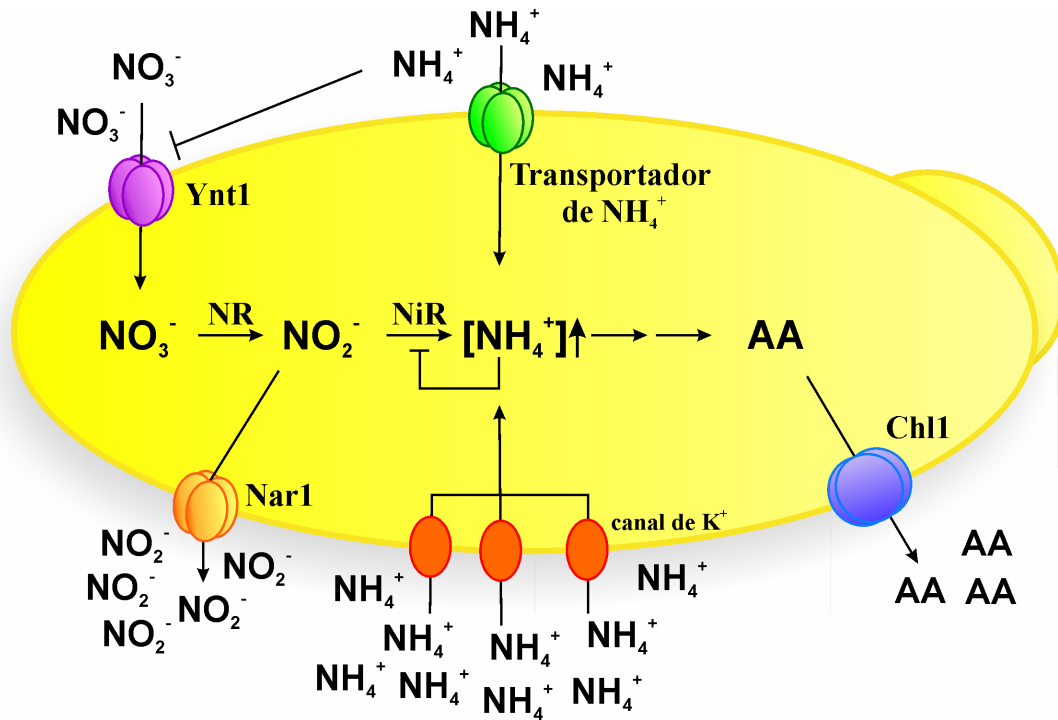


Figura 68. La excreción de aminoácidos actúa como un mecanismo de detoxificación de fuentes de nitrógeno reducidas. El nitrato transportado por Ynt1 es reducido por acción de la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) hasta amonio. La acumulación intracelular de amonio produce una regulación negativa sobre el gen que codifica la nitrito reductasa, incrementando la tasa de excreción de nitrito. El amonio es incorporado a los esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos (AA) que son excretados a través de Chl1 cuando las fuentes nitrogenadas reducidas alcanzan niveles intracelulares tóxicos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. *HpNAR1* es el único miembro de la familia FNT (*Formate Nitrite Transporter*) identificado en el genoma de *H. polymorpha*.
2. Nar1 excreta nitrito y participa en la detoxificación de este anión tóxico, siendo el único sistema con dicha actividad identificado hasta el momento en *H. polymorpha*. Nar1 también excreta nitrato, actuando de forma secuencial con Ssu2 de tal forma que el nitrato es excretado por Nar1 cuando los niveles intracelulares superan la capacidad de excreción a través de Ssu2.
3. Nar1 se localiza en la membrana plasmática independientemente de la fuente de nitrógeno presente en el medio.
4. El gen *HpNAR1* no está sujeto a represión catabólica por nitrógeno aunque muestra una expresión ligeramente superior en nitrato. La fuente de carbono no ejerce regulación postraduccional sobre Nar1.
5. La cepa $\Delta ynt1\Delta nar1$ no presenta cambios significativos en el transporte de nitrito indicando que Nar1 no transporta nitrito hacia el interior de la célula.
6. *HpCHL1* es el único gen identificado en el genoma de *H. polymorpha* que codifica una proteína con similitud a los transportadores de la familia NRT1 (PTR), cuya expresión está inducida en nitrato.
7. Chl1 es un transportador de la membrana plasmática con escaso o nulo papel en el transporte de nitrato. Chl1 podría estar implicada en la detoxificación de fuentes reducidas a través de la excreción de aminoácidos.
8. La acumulación intracelular de fuentes reducidas en $\Delta chl1$ conduce a una menor activación de la vía calcineurina.

MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

1. 1. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron: i) *Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene, U.S.A.) *recA1 endA1 gyrA96(Nal^r thi-1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac* F'[*proAB lacZΔM15 Tn10 (Tet^r)*] empleada en la amplificación rutinaria de ADN plasmídico; ii) *E. coli* DH5α: (Φ 80*dlacZΔM15*) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁻) supE44 relA1 deoR Δ(laZYA-argF)* U169 usada también en la amplificación de ADN plasmídico y en la obtención de plásmidos que no fueron obtenidos en la cepa XL1 Blue; iii) SCS110: *rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dan dcm supE44 Δ(lac-proAB)* F'[*traD36 proAB lacIqZΔM15*] empleada para obtener el ADN plasmídico no metilado.

1. 2. Cepas de levaduras.

Se utilizó como cepa silvestre *H. polymorpha* NCYC 495 (*syn.* CBS₁₉₇₆, ATCC₁₄₇₅₄, NRRL-Y-1789, VKM-Y-1397) (Wickerham, L.J. 1951) y cepas derivadas del doble mutante auxotrófico NCYC 495 *ura3 leu2*. El apéndice I resume los genotipos de las cepas empleadas, así como su nombre y origen.

Mayoritariamente se usaron cepas prototróficas complementando las auxotrofías *leu2* y *ura3* con los plásmidos portadores de los genes *LEU2* y *URA3* de *H. polymorpha* (Agaphonov, M.O. et al., 1994; Marzluf, G.A., 1997).

1. 3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano.

En el crecimiento de las bacterias se usó medio sólido y líquido. El medio de crecimiento usado fue LB (Luria Bertani). El medio líquido se preparó disolviendo los componentes en agua destilada, tamponándolo y esterilizándolo en autoclave durante 20 min a 121°C y 1.1 bar de presión. Para los medios sólidos se añadió Bacto-Agar a una concentración de 2 % (p/v). Los antibióticos, previamente filtrados, se añadieron al medio estéril templado a partir de una solución concentrada 500 veces. Las concentraciones finales fueron 50 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de tetraciclina. En el caso del antibiótico zeocina se añadieron 2.5 µg/µl al medio templado a 55°C a partir de una disolución concentrada de 100 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Las bacterias se crecieron a partir de la siembra de una colonia, tanto en medios sólidos como en la obtención de preinóculos usados para la inoculación de matraces Erlenmeyer que contienen un volumen de medio correspondiente a un quinto de su capacidad, con una agitación orbital de 200 rpm. El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la DO a 660 nm.

En la preparación de células competentes, es decir, susceptibles de ser transformadas con ADN plasmídico, se usó el medio SOB. La incubación de las células tras la transformación se llevó a cabo en medio SOC, con idéntica composición que el SOB y suplementado además con glucosa 20 mM.

En la conservación de las bacterias durante largos períodos se congeló a -80°C en glicerol al 15% (v/v).

Medio LB	Medio SOB
Bacto-Triptona 1 % (p/v)	Triptona 2 % (p/v)
Extracto de levadura 0.5 % (p/v)	Extrato de levadura 0.5 %
NaCl 0.5 % ó 1 % (p/v) según el antibiótico empleado	NaCl 10 mM
Ajustado a pH 7 con NaOH 1N	KCl 2.5 mM
	MgCl ₂ 10 mM ¹
	MgSO ₄ 10 mM ¹

¹El cloruro magnésico y sulfato magnésico se añadieron al medio a partir de disoluciones concentradas estériles.

1. 4. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de levaduras.

La preparación de los medios de crecimiento se realizó disolviendo los diferentes componentes en agua MilliQ y se sometió a la esterilización en las mismas condiciones que la usada en los medios de bacterias. En la preparación de medios sólidos se empleó Bacto-Agar al 2 % (p/v). El crecimiento de *H. polymorpha* en medio no selectivo o medio rico se llevó a cabo en YPD. El medio mínimo usado en el crecimiento selectivo se denomina YG, compuesto por “Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate” (YNB, Difco) al 0.17 % (p/v), que contiene todos los cofactores y vitaminas necesarias, y glucosa al 2 % (p/v). La adición de la fuente nitrogenada a este medio, en forma de cloruro amónico, recibió el nombre de YGNH; cuando se usó nitrato sódico pasó a denominarse YGNO y cuando se añadió nitrito sódico se denominó YGNO₂. El medio YGAS contiene “Yeast nitrogen base without amino acids” (YNB, Difco) al 0.67 % (p/v) que aporta todos los componentes necesarios para el crecimiento de la levadura y como fuente de nitrógeno 37.8 mM de sulfato de amonio. La concentración de la fuente de nitrógeno usada en los diferentes experimentos se indica a continuación de las siglas del medio.

YPD

Glucosa 2 % (p/v)

Peptona 2 % (p/v)

Extracto de levadura 1 % (p/v)

Agar 2 % (p/v)

Las auxotrofías de uracilo y leucina se suplieron añadiendo estos compuestos a partir de soluciones 50 veces concentradas y estériles, a unas concentraciones finales de 0.18 mM y 0.23 mM, respectivamente. En la selección de transformantes portadores del gen *ble*, que confiere resistencia al antibiótico zeocina se usó el medio sólido YPD suplementado con 10 µg/µl del antibiótico a partir de una disolución concentrada de 100 mg/ml.

H. polymorpha crece a 37° C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 42° C (Levine y Cooney, 1973). El crecimiento se realizó en placas de Petri o en matraces Erlenmeyer con una agitación orbital de 200 rpm. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica 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:

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

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

Composición del *Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate* (concentraciones en el medio)

ácido aminobenzoico	p- 200 µg/l	biotina	2 µg/l
ácido bórico	500 µg/l	cloruro cálcico	0.1 g/l
pantotenato cálcico	400 µg/l	sulfato de cobre	40 µg/l
cloruro férrico	200 µg/l	ácido fólico	2 µg/l
inositol	2 mg/l	sulfato magnésico	0.5 g/l
sulfato de manganeso	400 µg/l	niacina	400 µg/l
ioduro de potasio	100 µg/l	fosfato potásico monobásico	1 g/l
piridoxina hcl	400 µg/l	riboflavina	200 µg/l
cloruro sódico	0.1 g/l	molibdato sódico	200 µg/l
tiamina hcl	400 µg/l	sulfato de zinc	400 µg/l
pH final: 4,5			

Yeast nitrogen base w/o amino acids, igual composición más sulfato amónico 5 g/l

1. 4. 1. Medios de cultivo y condiciones en la inducción de los genes de asimilación de nitrato de *H. polymorpha*.

Con el fin de inducir la expresión de los genes de asimilación de nitrato de *H. polymorpha* las células se crecieron durante la noche en YGNH 5 mM hasta una DO = 2.7 unidades. Se recogieron mediante centrifugación a 4863 x g (5000 rpm) durante 7 min, se resuspendieron en agua para eliminar restos del medio anterior, se volvieron a centrifugar y finalmente se resuspendieron en medio de inducción YGNO. La concentración de nitrato sódico varió de 1 a 10 mM según el experimento y en ocasiones se emplearon concentraciones de hasta 20-50 mM. Las células se incubaron en este medio de 30 a 120 min en la mayoría de los experimentos. En ocasiones, antes de transferir las células al medio de inducción se incubaron en un medio sin nitrógeno (YG) durante 60-90 min con el fin de obtener niveles de inducción elevados y reproducibles.

1. 4. 2. Preparación de las cepas en la siembra por goteo.

Las siembras por goteo, junto con el crecimiento en medio líquido, permite la caracterización fenotípica de las cepas en estudio. Las cepas estudiadas en este trabajo fueron goteadas sobre medios sólidos con diferente composición cuya finalidad fue la determinación de los fenotipos asociados a la delección o sobreexpresión de un gen, donde las diferencias en el crecimiento entre cepas vienen dadas en el número e intensidad de las diluciones crecidas. Para ello, una colonia se creció en 5 ml de YPD líquido hasta alcanzar la fase estacionaria. De cada precultivo se recogió 1 ml de medio, en tubo eppendorf estéril, por centrifugación a $16060 \times g$ (13000 rpm) durante 1 minuto. Las células se lavaron con 1 ml de agua MilliQ estéril centrifugando de la misma forma y resuspendiéndolas en 500 μ l de agua estéril. A continuación se realizaron diluciones (entre 1/4 a 1/16) de las suspensiones celulares y se determinó el número de células lavadas según la expresión (I), usando el lector de microplaca Multi Skan EX (Labsystems). Sobre microplacas, esterilizadas por exposición a UV durante la noche, se realizaron hasta 5 diluciones seriadas en agua estéril, de tal forma que 5 μ l de cada dilución contuvieran de 10^6 a 10^2 células. En el goteo se usó una pipeta multicanal (Finnpipette BioControl-Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia) que permitió la siembra simultánea de 8 cepas por placa. Las placas se incubaron a $37^\circ C$ durante 48 h.

2. Transformación de microorganismos.

2. 1. Transformación de bacterias.

La transformación de bacterias se realizó principalmente por choque térmico. En la obtención de células competentes de *E. coli* se desarrolló el protocolo descrito por Hanahan (1986). En la obtención de células competentes se partió de un precultivo (5 ml) crecido hasta fase estacionaria en LB suplementado con tetraciclina, en el caso de la cepa XL1 Blue. Se inocularon

200 ml de medio SOB (con o sin tetraciclina según la cepa bacteriana), con 0.18 vol. del preinoculo, y se dejaron crecer hasta fase exponencial ($DO_{595} = 0.4 - 0.6$) a 37° C. A continuación se enfrió el cultivo en hielo durante 30 min, seguido de una centrifugación durante 7 min, 4° C, a 4863 x g (5000 rpm). Se resuspendieron en 1/3 vol. de la solución RF1 frío (66 ml), se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó en las mismas condiciones. En este punto las células se resuspendieron en 1/12 vol. de RF2 frío (16 ml), incubándose 15 min en hielo. Finalmente se prepararon alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf estériles que se enfriaron rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Las células se almacenaron a -80° C hasta el momento de uso.

RF1	RF2
RbCl 100 mM	RbCl 10 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O 50 mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O 75 mM
Acetato de sodio 30 mM	Glicerol 15% (v/v)
CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 mM	MOPS 10 mM (ácido 3-[morfolino] propanosulfónico)
Glicerol 15% (v/v)	
pH 5.8 con ácido acético. Esterilizar por filtración	pH 6.8 con NaOH. Esterilizar por filtración

En la transformación se añadió a las células competentes, una vez descongeladas el ADN plasmídico (en un volumen no superior a 10 µl), incubando la mezcla en hielo 30 min. A continuación, se sometió a choque térmico durante 90 s a 42° C, y se incubaron inmediatamente en hielo 2 min. Se añadieron 800 µl de SOC y se incubó la mezcla a 37° C en agitación 1 hora. Finalmente las células se recogieron a la máxima velocidad en una microcentrífuga durante 1 min y se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos adecuados, generalmente ampicilina y zeocina. La eficiencia de la transformación es de unos 10⁷ transformantes/µg de ADN. En la selección por color de las colonias portadoras de plásmidos recombinantes (α -complementación del gen *lacZ*) (Sambrook y Russell 2001),

las células se sembraron en placas de LB-agar sobre las que se extendieron 20 μ l de X-gal a partir de la disolución comercial concentrada (50 mg/ml) (Promega, Madison, WI, USA) y 100 μ l de IPTG 100 mM, incubando las placas a 37° C al menos unos 30 min antes de la siembra de las bacterias. Las colonias de color azul son las que portan el plásmido comercial religado mientras que las de color blanco portan el plásmido con el inserto de interés. El color azul de las colonias se intensifica al incubar las placas a 4° C.

En el caso de que se necesite una eficiencia de transformación mayor que 10^7 transformantes/ μ g de ADN se realizó la transformación por electroporación, siguiendo las recomendaciones del fabricante del electroporador BTX 600 (Electro Cell Manipulator® 600). Las bacterias electrocompetentes se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento que en la obtención de bacterias competentes para transformación por choque térmico. Sin embargo, los lavados fueron realizados en agua MilliQ estéril y fría, y las alícuotas de bacterias se realizaron en 40 μ l de glicerol, frío y estéril, al 10 % conservándolas a -80° C hasta el momento de uso. El proceso de transformación se realizó colocando la mezcla de células competentes y ADN plasmídico en el fondo de una cubeta de electroporación fría de 2 mm de separación entre electrodos. Se aplicó un pulso eléctrico de 5 milisegundos (campo eléctrico de 2.5 KV·cm, 50 μ F de capacitancia y 129 Ω de resistencia) y a continuación se añadió rápidamente 800 μ l de SOC, resuspendiendo las células con cuidado. La mezcla se incubó a 37° C durante 1 hora sin agitación y se sembraron de la misma forma que las bacterias transformadas por choque térmico.

2. 2. Transformación de *H. polymorpha*.

La preparación de células competentes de levaduras y la transformación de las mismas se llevó a cabo según el protocolo descrito por Faber *et al.*, (1994). Se partió de un precultivo de YPD (5 ml), crecido hasta fase estacionaria a 37° C. Se usó 0.15 vol. del mismo para inocular 50 ml de YPD precalentado a

37° C, y se dejó crecer hasta alcanzar una $DO_{660} = 1.2 - 1.5$ ($\sim 10^8$ células/ml). Las células fueron recogidas por centrifugación a $4,836 \times g$ (5000 rpm) durante 7 min y resuspendidas en 0.2 vol. del tampón KPi, pH 7.5, al que se añadió DTT a una concentración final de 25 mM, incubándose en dicho buffer durante 15 min a 37° C. Luego se lavaron dos veces con tampón STM frío; el primer lavado se hizo con 1 vol. y el segundo con 0.5 vol. En todo momento las células se mantuvieron en hielo y se centrifugaron en las mismas condiciones entre lavados. Posteriormente se resuspendieron en 0.005 vol. de STM y se prepararon alícuotas de 60 μ l que se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándolas a -80° C hasta el momento de uso.

KPi 50 mM	DTT	STM
K_2HPO_4 1M	Preparar en 0.01 M de acetato de sodio	Sacarosa 270 mM
KH_2PO_4 1M	Ajustar el pH 5.2 y esterilizar por filtración	Tris-HCl 10 mM
Ajustar el pH 7.5	Conservar a -20° C	MgCl ₂ 1 mM
		Ajustar el pH 7.5

La cantidad de ADN utilizado en las transformaciones fue de ~ 1 μ g, en un volumen no superior a 5 μ l que se añadió a las células competentes descongeladas sobre hielo. La mezcla se colocó en el fondo de una cubeta de electroporación fría de 2 mm de separación entre electrodos, aplicándole un pulso de 5 milisegundos (campo eléctrico de 7.5 KV·cm, 50 μ F de capacitancia y 129 Ω de resistencia). Tras el pulso eléctrico se añadió a la cubeta 1 ml de YPD resuspendiendo las células con cuidado y se incubó la mezcla a 37° C durante 1 hora sin agitación. Las células se recogieron mediante centrifugación durante 60 s a máxima velocidad en una microcentrífuga, se lavaron con 1 ml de YG y finalmente se resuspendieron en 200 μ l del medio mínimo. La siembra de las

células se hizo sobre placas que contenían el medio apropiado en la selección de los transformantes.

3. Técnicas relacionadas con proteínas.

3. 1. Manipulación de extractos proteicos.

3. 1. 1. Obtención de extractos celulares.

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de células en fase exponencial ($DO_{660} = 2-2.6$) aproximadamente 50 mg de células (peso fresco) mediante centrifugación a $4863 \times g$ (5000 rpm) durante 5 min a $4^\circ C$ en tubos de vidrio de fondo redondo. Las células se lavaron con agua fría y se congelaron a $-20^\circ C$ hasta el momento de uso. Una vez descongeladas sobre hielo se añadió a cada muestra de 250 a 300 μl de tampón de extracción, en la determinación de la actividad nitrato reductasa o β -galactosidasa respectivamente, conteniendo además el cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini Tablets, Roche, Indianapolis, EEUU). Los extractos celulares se mantuvieron durante todo el proceso a $4^\circ C$. A continuación se sometieron a rotura mecánica con bolas de vidrio ($\varnothing 0.5$ mm) en un homogenizador *FastPrep* (FP120, BIONOVA, Francia) durante 20 segundos a una velocidad de 6 m/s, rompiendo las células por cizallamiento. Tras enfriar los viales en hielo, se perforaron por el fondo con la ayuda de una aguja hipodérmica caliente y se centrifugaron sobre tubos nuevos a baja velocidad, $820 \times g$ (3200 rpm) durante 1 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se clarificó centrifugándolo a $16060 \times g$ (13000 rpm) durante 60 s. Posteriormente el sobrenadante se clarificó mediante centrifugación de $10580 \times g$ (13000 rpm) durante 10 min a $4^\circ C$. Así obtuvimos los extractos proteicos totales libres de los restos celulares generados por la rotura. Estos extractos proteicos fueron empleados en los ensayos de actividad nitrato reductasa y β -galactosidasa.

Tampón de extracción

Tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.4

FAD 20 μ M

EDTA 1 mM

3. 1. 2. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares.

En la determinación de las actividades enzimáticas y en el análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método Bradford (1976) usando el reactivo de Bradford del *kit* comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) y γ -globulina como proteína patrón. Los extractos se diluyeron de 5 a 10 veces en agua y se utilizó de 5 a 10 μ l del diluido en la determinación de la concentración de proteínas, añadiendo 200 μ l del reactivo de Bradford. La reacción colorimétrica se dejó desarrollar durante 5 min y se determinó la absorbancia a 590 nm en un lector de placas multipocillo (Thermo Labsystems, Finlandia).

3. 2. Determinación de la actividad nitrato reductasa.

La obtención de los extractos proteicos fue necesaria en la determinación de la actividad nitrato reductasa (NR) de las cepas estudiadas en este trabajo. En dicha determinación se usó el tampón de ensayo de la enzima.

Tampón de ensayo

Tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.4

FAD 40 μ M

NaNO₃ 40 mM

La actividad nitrato reductasa en levaduras se determinó en un volumen de reacción de 500 μ l. La mezcla de reacción contenía 250 μ l de tampón de

ensayo y de 10 a 20 μl de extracto, completándose hasta 450 μl con agua. Esta mezcla se incubó a 30° C, iniciando la reacción mediante la adición de 50 μl de NADH 2 mM. Después de 15 min la reacción se detiene por adición de 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) (208). Estas dos soluciones permiten la detección colorimétrica del nitrito producido por acción de la nitrato reductasa. El desarrollo de color es proporcional a la concentración del ión. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia de la solución a 540 nm y la pendiente de la curva de calibrado obtenida. La actividad específica nitrato reductasa se expresa como nmoles de nitrito·minuto⁻¹ (mU) · mg de proteína⁻¹; y se calcula según la fórmula:

$$\text{Act. NR} = [DO_{540}/\text{pendiente de la curva de nitrito}] / [V_{\text{extracto}}(\text{ml}) \times \text{proteínas totales (mg/ml)} \times \text{tiempo (min)}]$$

3. 3. Determinación de la actividad β -galactosidasa.

La determinación de la actividad β -galactosidasa mediante extractos se realizó para medir con el fin de determinar la expresión de los genes en estudio mediante la fusión de sus promotores al gen *lacZ*. En dicha determinación se usó el tampón de ensayo de la enzima denominado tampón Z.

Tampón Z

KCl 10 mM

MgSO₄·7H₂O 1 mM

β -mercaptoetanol 0.27 % (v/v)

Na₂HPO₄ 60 mM pH 7

NaH₂PO₄ 40 mM pH 7

La actividad β -galactosidasa se valoró en un volumen de reacción de 600 μl . La mezcla de reacción contenía de 10 a 30 μl de extracto, 450 μl de

tampón Z y se completó con agua MilliQ hasta un volumen final de 600 µl. La mezcla de reacción se incubó a 30° C durante 5 min tras los cuales se inició la reacción por adición de 100 µl de ONPG (*o*-nitrofenol β-D-galactopiranosido) recién preparado a 4 mg/ml en tampón Z. La reacción se dejó desarrollar hasta que la disolución tomó un color amarillo pálido y se detuvo añadiendo 250 µl de Na₂CO₃ 1 M. La absorbancia se determinó a 420 nm. Un valor de 0.0045 unidades de A_{420nm} corresponde a 1 nmol/ml de *o*-nitrofenol producido. La actividad específica se expresa en nmoles de *o*-nitrofenol · minuto⁻¹(mU) · mg de proteína⁻¹; y se calculó según la fórmula:

$$\text{Act.} = [DO_{470}] \times V_{\text{reacción}}(\text{ml}) / [0.0045 \times V_{\text{extracto}}(\text{ml}) \times \text{proteínas totales} (\text{mg/ml}) \times \text{tiempo} (\text{min})]$$

3. 3. 1. Determinación de la actividad β-galactosidasa *in situ* a partir de células permeabilizadas con cloroformo sobre filtros.

Las células se sembraron en medio YGNH 5 mM sólido y se incubaron a 37° C hasta que las colonias adquirieron un tamaño entre 1-3 mm Ø. A continuación y con ayuda de un palillo estéril se ordenaron las colonias a modo de estrías en medio YGNH y medio YGNO 5 mM (medio de inducción, siempre y cuando se tratara de genes inducidos por nitrato) donde se incubaron durante 48 h. Transcurrido este tiempo se depositaron filtros de papel Whatmman 3 MM sobre las placas con el fin de transferir las células al papel. Como control del ensayo se transfirieron células crecidas en medio YGNH 5 mM, donde la expresión de los genes de la vía de asimilación de nitrato no está inducida.

La permeabilización de las células se logró sumergiendo los filtros en cloroformo de forma que las células quedaran en contacto directo con el disolvente durante 5 min. Se usó un recipiente de vidrio de 23 x18 cm, con una profundidad de 3 cm, que se rellenó a la mitad de su capacidad total. Transcurrido ese tiempo y una vez eliminado el cloroformo por evaporación, cada filtro se puso en contacto con 1.5 ml de la mezcla de reacción (Tampón Z +

X-gal a 1 mg/ml), usando la base de una placa de Petri, manteniéndolas en oscuridad a 30° C. El desarrollo de la actividad, detectable por la coloración azul que adquieren las células, tuvo lugar después de 15-20 min en las células que habían crecido en YGNO 5 mM y alcanzó su máximo a las pocas horas de incubación. Las células que habían crecido en YGNH 5 mM desarrollaron el color a partir de la primera hora y el máximo de coloración se alcanzó después de 18 h.

3. 4. Obtención de extractos de proteínas de membrana para SDS-PAGE.

Los extractos se obtuvieron a partir de 50 mg de células (peso fresco) mediante la adición de tampón de extracción frío. La suspensión, que siempre se mantuvo en hielo durante todo el proceso, se transfirió a un tubo de 1.5 ml al que se añadieron bolas de vidrio de 5 mm Ø. Se sometieron a 20 segundos de rotura mecánica en un *FastPrep* (FP120, BIONOVA, Francia) a una velocidad de 6 m/s. Tras enfriar los viales en hielo, se perforaron por el fondo con la ayuda de una aguja hipodérmica caliente y se centrifugaron sobre tubos nuevos a baja velocidad, 820 x g (3200 rpm) durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se clarificó mediante 3 centrifugaciones consecutivas a 820 x g (3200 rpm) durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante clarificado se centrifugó a 20500 x g (15000 rpm) durante 30 min a 4° C para obtener una fracción enriquecida en membrana plasmática. Después de esta centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 70 µl de disolución de resuspensión con ayuda de una micropipeta. Se usaron 10 µl de extracto para la cuantificación de las proteínas y al resto se le añadió 20 µl de tampón de desnaturalización 4X. Finalmente los tubos se calentaron a 40° C durante 30 min y se conservaron a -20° C hasta la electroforesis.

Tampón de extracción	Disolución de resuspensión	Tampón de desnaturalización (4X)
EDTA 15 mM	Tritón X-100 0.025 % (p/v)	SDS 12 % (p/v)
EGTA 15 mM	EDTA 15 mM	β -mercaptoetanol 6 % (v/v)
Na ₂ P ₂ O ₇ 10 mM	EGTA 15 mM	Glicerol 30 % (v/v)
NaN ₃ 10 mM	Na ₂ P ₂ O ₇ 10 mM	Azul de bromofenol 0.05 % (p/v)
NaF 10 mM	NaN ₃ 10 mM	Tris-HCl 150 mM pH 7
Inhibidores de proteasas	NaF 10 mM	
<i>Complete Mini</i>		
PMSF 2 mM		
Tris-HCl 50 mM pH 7.5		

3. 5. Tratamiento de los extractos proteicos con λ -proteína fosfatasa.

Para desfosforilar a Nar1-HA se trataron 20 μ g de proteínas de membrana con 150 U de λ -proteína fosfatasa (New England Biolabs, Beverly, EEUU) durante 25 min a 30°C en presencia del tampón de la λ -proteína fosfatasa y 2 mM de MnCl₂. Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado anterior excepto porque el tampón de extracción y disolución de resuspensión carecían de EDTA, EGTA, NaF, Na₂P₂O₇ y NaN₃. Después del tratamiento con λ -proteína fosfatasa se añadió tampón de desnaturalización (4X) y se calentaron los extractos a 40°C durante 30 min.

Tampón de reacción de λ -proteína fosfatasa

EDTA 0.1mM

ditiotreititol 5 mM

Brij35 0.01% (p/v)

Tris-HCl 50 mM pH 7.5

3. 6. Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las proteínas se separaron por electroforesis usando minigeles discontinuos de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) desarrollando la electroforesis en una cubeta vertical Mini-Protean[®]3 (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los geles discontinuos se elaboraron a partir de una disolución de acrilamida/bis-acrilamida [30 % (p/v) monómero total; 2.67 % (p/v) entrecruzamiento]. El gel superior, o gel de compactación de la muestra, de unos 2 cm de largo, se preparó al 4 % (p/v) de monómero total, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel inferior, o gel de resolución de la muestra, se preparó con un porcentaje que osciló entre el 10 al 12 % (p/v) según la aplicación, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8. La concentración de SDS en ambos geles fue 0.1 % (p/v).

La electroforesis se desarrolló en el tampón de electroforesis aplicando tres diferencias de potencial distintas a lo largo del tiempo. Se inició con 50 V hasta que la muestra entró completamente en el gel de compactación, luego se aumentó hasta 150 V para provocar la compactación y 100 V una vez dentro del gel de resolución hasta el final de la electroforesis.

Tampón de electroforesis (pH 8.3)	Acrilamida/bis-acrilamida 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 determinar el desarrollo de la electroforesis así como para estimar la masa molecular de las bandas se usó el marcador de masa molecular preteñido con colorantes específicos (Dual Color, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) (Figura 69).

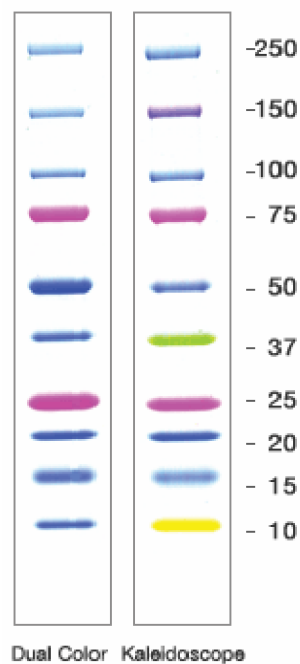


Figura 69. Marcadores preteñidos *Precision Plus Protein™ Standards*, *Kaleidoscope™* y *Dual Color*.

3. 7 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

Las proteínas una vez separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EEUU) mediante el dispositivo de electrotransferencia Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, Hercules, CA,

EEUU) con el fin de realizar a continuación la inmunodetección de la proteína específica (*western blot*). Las membranas se humedecieron en metanol durante unos 15 s, con el fin de activarlas, y a continuación fueron sumergidas en tampón de transferencia. Se pusieron en contacto con los geles de poliacrilamida como describe el manual del aparato y en la orientación adecuada respecto a los electrodos de la cubeta. La transferencia se realizó en tampón de transferencia aplicando una diferencia de potencial constante de 100 V durante 90 min a 4° C. Una vez finalizada la transferencia las membranas se dejaron secar y se conservaron a 4° C hasta el momento de la inmunodetección, para lo cual fue preciso activar las membranas en metanol durante unos segundos y retirar el exceso del mismo con PBS-T.

Tampón de transferencia (pH 8.3)

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

Metanol 20 % (v/v)

3. 8. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas (*western blot*).

Las membranas se bloquearon con la disolución de bloqueo (leche en polvo desnatada La Asturiana 5 % (p/v) disuelta en PBS-T) durante 60 min con agitación a temperatura ambiente. Después del bloqueo se incubó con el anticuerpo primario a la dilución indicada en la tabla 9. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en una disolución de leche desnatada al 0.5 % (p/v) en PBS-T durante 60 min. A continuación se lavaron las membranas con PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo realizando tres lavados consecutivos de 4, 6 y 8 min cada uno. Al finalizar los lavados se incubó la membrana durante 30 min con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a peroxidasa de rábano a la concentración indicada en la tabla 9 en una disolución de leche desnatada al 0.5 % (p/v) en PBS-T. Seguidamente se retiró el exceso de anticuerpo secundario lavando las membranas de la misma forma que para el

anticuerpo primario y se llevó a cabo la detección de las bandas específicas mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal quimioluminiscente se detectó directamente usando la cámara CCD del sistema de análisis ChemiDoc™ XRS Gel Documentation systems y se usó el programa de imagen Bio-Rad Quantity One® (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) o por impresión de una película radiográfica.

	Antígeno	Naturaleza	Dilución empleada	Origen
Anticuerpos primarios	Ynt1	Inmunosuero de conejo	1:1.500	GMN ¹
	HA	Anticuerpo monoclonal	1:1000	Roche
	ScPma1	Inmunosuero de conejo	1:40.000	Dr. R. Serrano ²
Anticuerpos secundarios	IgG de ratón	Inmunosuero de oveja	1:3.000	Sigma
	IgG de conejo	Inmunosuero de cabra	1:50.000	Amersham

¹GMN: Grupo del Metabolismo del Nitrógeno

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

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en este trabajo y concentraciones de uso.

4. Determinación del transporte de nitrato.

El transporte de nitrato se determinó siguiendo la desaparición del nitrato del medio (Machín et al., 2004 (197 RM)). Los cultivos de levaduras se crecieron en medio YGNH hasta alcanzar los 10 mg de células/ml. A continuación se incubaron en medio YGNO 1-5 mM o se ayunaron en medio YG durante 90 min. Se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua fría y se resuspendieron en 4.8 ml de YG MES-Tris 25 mM pH 5.5 a una concentración de 5-10 mg de células/ml. Esta suspensión se realizó en tubos tipo Falcon de 50 ml y se incubaron en un baño a 37° C con agitación. Transcurridos 2 min de incubación se inició el consumo con la adición de nitrato a una concentración

final que osciló entre 100 y 500 μM . A partir de este momento se tomaron alícuotas de 200 μl del medio, vertiéndose cada una sobre 100 μl de HCl 0.35 M con la finalidad de detener el consumo. Finalizado el ensayo, se midió la $\text{DO}_{660\text{nm}}$ de la suspensión celular que aún quedaba en el tubo Falcon para determinar la concentración de células y las muestras tomadas a lo largo del tiempo se neutralizaron añadiendo 40 μl de Tris 1M. Las muestras se centrifugaron a 16.060 x g (13.000 rpm) durante 3 min. Las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de la determinación del nitrato.

La concentración de nitrato de cada alícuota se determinó transformando el nitrato en nitrito mediante el uso de la NR purificada de *Aspergillus sp* (Roche, Indianápolis, IN, EEUU) o de *H. polymorpha* (The Nitrate Elimination Company, Inc., Lake Linden, MI, EEUU) usando NADH como donador de electrones en la reacción de reducción. La concentración del nitrito producido se determinó colorimétricamente (Snell y Snell, 1949). El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera: de cada muestra se tomaron dos volúmenes de 30 μl que se transfirieron a una placa multipocillo. A uno de estos volúmenes se le añadió 30 μl de agua, con el fin de determinar el nitrito excretado, y al otro se añadió 30 μl de mezcla de ensayo, conteniendo la NR purificada (*The Nitrate Elimination Co, Inc. (NECi™)*) y el NADH, con el fin de determinar el nitrito resultante de la reducción del nitrato junto con el nitrito excretado. En la placa también se incluyó una curva patrón de nitrato. La placa multipocillo se incubó a 30°C durante 1 h y se detuvo la reacción añadiendo 60 μl de reactivo A (N-(1-naftil)-etilendiamina 0.02 % (p/v)) y 60 μl de reactivo B (sulfanilamida 1 % (p/v) en HCl 1 % (v/v)). La reacción se dejó desarrollar durante 15 min y se midió la absorbancia a 540 nm.

El valor de consumo de nitrato se obtuvo representando el valor de absorbancia de nitrito total sustraído el nitrito excretado para cada punto frente al tiempo. La velocidad de consumo es la pendiente del tramo lineal de cada

representación expresada en nmoles de nitrato $\cdot \text{min}^{-1}$ y relativizada por la concentración de células del ensayo.

Mezcla de Ensayo

NR purificada 7.5×10^{-5} U/ μl

NADPH/NADH 150 μM

Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5

5. Determinación del transporte de nitrito.

El transporte de nitrito se determinó siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el consumo de nitrato. Las células fueron incubadas previamente en YGNO 1-5 mM o ayunadas en medio YG durante 90 min. A continuación se resuspendieron en 4.8 ml de YG MES-Tris 25 mM pH 5.5 ó 6. En ocasiones el ensayo de consumo se realizó a pH 4 utilizando como tampón el ácido tartárico-Tris 20 mM. Esta suspensión se realizó en un tubo tipo Falcon de 50 ml y se incubaron en un baño a 37° C con agitación. Transcurridos 2 min de incubación se inició el transporte con la adición de nitrito a una concentración final que osciló desde los 100 a los 500 μM . Se retiraron 200 μl de medio a los tiempos indicados en cada ensayo y se vertieron sobre tubos de 1.5 ml conteniendo 200 μl de reactivo B (sulfanilamida 1 % (p/v) en HCl 1 % (v/v)) con el fin de detener el consumo. Finalizado el ensayo, a cada tubo se le añadió 200 μl de reactivo A (N-(1-naftil)-etilendiamina 0.02 % (p/v)). Los tubos se centrifugaron 3 min a 16060 x g (13000 rpm) y a continuación se determinó la concentración de nitrito para cada punto midiendo la absorbancia a 540 nm después de 15 min.

La velocidad de consumo de nitrito se calculó a partir de la pendiente del tramo lineal de la representación de la concentración de nitrito frente al tiempo, expresada en nmoles de nitrito $\cdot \text{min}^{-1}$ y relativizada por la concentración de células en el ensayo.

6. Acumulación de nitrato y nitrito intracelular.

Las células de levaduras de *H. polymorpha* se caracterizan por consumir nitrato y nitrito. Su entrada en la célula conlleva una reducción hacia amonio por la acción consecutiva de las actividades NR y NiR. También se observa la salida de nitrito hacia el medio extracelular cuando su concentración intracelular supera la capacidad de catálisis de la NiR. Al bloquear la salida de nitrato/nitrito se produce su acumulación en las células, la cual se incrementa en las cepas carentes de NR o NiR.

Las células se crecieron en medio YGNH hasta 10 mg/ml. A continuación se lavaron y se resuspendieron en medio YG manteniéndolas en ayuno. Los periodos de ayuno a los que se expusieron las células fueron variables según se determinara la acumulación intracelular de nitrato o de nitrito. Así las células sometidas a acumulación de nitrato se ayunaron durante 60 min mientras que en la acumulación de nitrito se realizaron periodos de ayuno desde los 30 min hasta los 120 min en función de las cepas y de la inducción previa con nitrato (1 ó 5 mM). Durante todo el proceso las células se incubaron a 37 °C con agitación. En la mayoría de los casos las concentraciones usadas fueron de 1 mM de nitrato y nitrito. En la detección del nitrato/nitrito intracelular se recogieron 250 mg de células sobre 1 vol de agua fría. Se centrifugó el medio a 4863 x g (5000 rpm) durante 7 min y se lavaron nuevamente en agua fría. Las células fueron congeladas a -20° C hasta el momento de su uso.

La rotura celular se realizó en 1 ml de tampón de acumulación (tubo de 1.5 ml) que se calentó durante 5 min en un bloque térmico a 80° C. El material celular se centrifugó a 20500 x g (15000 rpm) durante 30 min trasvasando 1 ml de sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml. El sobrenadante se concentró hasta 0.5 vol en un concentrador de ADN (Heto, Dinamarca). Se adicionó 0.5 vol de agua MilliQ y se concentró nuevamente hasta alcanzar 0.5 vol. El procedimiento usado en la determinación del nitrato intracelular fue el descrito en la

determinación del transporte de nitrato (ver el apartado 4). En el caso de la determinación de nitrito intracelular se usaron 30 μ l de sobrenadante al que se adicionaron 30 μ l de agua bidestilada. A continuación se añadieron 60 μ l de reactivo B (sulfanilamida 1 % (p/v) en HCl 1 % (v/v)) y 60 μ l de reactivo A (N-(1-naftil)-etilendiamina 0.02 % (p/v)). La absorbancia se determinó después de 15 min a 540 nm usando el lector de microplaca Multi Skan EX (Labsystems).

Tampón de Acumulación

75 % de etanol

70 mM de HEPES-Tris pH 7.5

7. Determinación de amonio.

7. 1. Consumo de amonio.

El consumo de amonio se determinó siguiendo su desaparición del medio (Umbreit *et al.*, 1964 (300 RM)). Los cultivos de levaduras se crecieron en medio YGNH hasta alcanzar 20 mg de células/ml. A continuación se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en agua fría y se resuspendieron en medio YG ayunándolas durante 60 min. Las células se mantuvieron en agitación en un baño a 37° C. Al finalizar el ayuno se adicionó al medio 0.6 mM de amonio, retirando 1 ml de medio a los tiempos indicados que se vertieron sobre tubos de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron 3 min a 16060 x g (13000 rpm). Finalmente se hizo una dilución para que el cultivo quedara a 1/100 y a partir de estas muestras se llevó a cabo la determinación de amonio.

En la determinación de amonio se usaron 190 μ l del sobrenadante, previamente diluido 100 veces, al que se adicionó 10 μ l de reactivo de Nessler (Fluka, Alemania). A continuación se determinó la concentración de amonio para cada punto midiendo la absorbancia a 420 nm después de 2 min de la adición del reactivo de Nessler.

7. 2. Acumulación de amonio.

La determinación del amonio intracelular se llevó a cabo creciendo las células en medio YGNH hasta 10 mg/ml. Una vez alcanzada esta concentración se lavaron tres veces y se resuspendieron en medio YG manteniéndolas en estas condiciones en agitación 2 h a 37° C. Una vez finalizado el ayuno se añadió al medio cloruro de amonio 5 mM. Para la detección del amonio intracelular se recogieron 250 mg de células sobre 1 vol de agua fría. Se centrifugó el medio a 4863 x g (5000 rpm) durante 7 min y se lavaron nuevamente en agua fría. Las células fueron congeladas a -20° C hasta el momento de su uso.

El procedimiento seguido fue el mismo que en la determinación del nitrato y nitrito intracelular, con la excepción de que el sobrenadante obtenido no se concentró. Se usaron 190 µl del sobrenadante, al que se adicionó 10 µl de reactivo de Nessler (Fluka, Alemania). A continuación se determinó la concentración de amonio para cada punto midiendo la absorbancia a 420 nm después de 2 min de la adición del reactivo de Nessler.

8. Determinación de aminoácidos por HPLC.

Una vez que el nitrato se reduce a nitrito y éste a amonio la célula dispone del nitrógeno para sintetizar los aminoácidos. La carencia de aminoácidos afecta al metabolismo, y por ende, al crecimiento de las células en el medio de cultivo. Por ello se cuantificaron los aminoácidos con el fin de determinar si la cepa *ΔchlI* estaba afectada en el flujo de aminoácidos a través de la membrana plasmática. Las medidas fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Carlos Díaz, Dra. Elena Rodríguez y Dra. Beatriz Rodríguez del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de esta Universidad.

Los extractos usados en la determinación de los aminoácidos intracelulares se obtuvieron a partir de células crecidas en YGNH hasta los 10 mg/ml. Las células se lavaron y se inocularon en medio YGNH fresco manteniéndolas en agitación en un baño a 37° C durante 3 h. A continuación se recogieron 250 mg de células sobre 1 vol de agua fría. Se centrifugó el medio a 4863 x g (5000 rpm) durante 7 min y se lavaron nuevamente en agua fría. Seguidamente las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de acumulación y las muestras fueron procesadas según lo descrito en el apartado 6. Además de la determinación intracelular también se analizaron los aminoácidos presentes en el medio de cultivo con el fin de identificar y cuantificar los aminoácidos excretados. Para ello se centrifugó 1 vol. del medio de cultivo a 4863 x g (5000 rpm) durante 7 min y a continuación se filtraron 10 ml del sobrenadante con el fin de eliminar totalmente las células del medio. Tanto los extractos como el medio filtrado se mantuvieron a -80° C hasta el momento del análisis.

Los aminoácidos fueron sometidos a análisis por HPLC después de la derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC). AQC fue adquirido como parte del *kit* comercial AccQ Fluor (Waters Assoc., Milford, MA). En la derivatización de los aminoácidos se agregaron 60 µl del tampón de borato 200 mM, y 20 µl de reactivo AccQ Fluor y la mezcla se agitó durante unos segundos. El vial se calentó en un bloque térmico a 55 °C durante 10 minutos. En la preparación del estándar se combinaron 10 µl del estándar (estándar de aminoácidos hidrolizados, Waters Assoc., Milford, MA) con 70 µl de tampón de borato y 20 µl de reactivo AccQ Fluor, y se procesó de la misma manera que la muestra. Finalmente, se inyectaron en el sistema de HPLC 10 µl de muestra o 5 µl de la solución de estándares.

El sistema de HPLC consistió de un módulo de separación 2690 de Waters, y un detector de fluorescencia 474 de Waters (Waters Assoc., Milford, MA). La integración y proceso de los datos se realizó aplicando el programa Waters Millennium 32 Chromatography Manager (Rodríguez Galdón, B *et al.*;

2010). La separación de los derivatizados AQC se llevó a cabo usando una columna AccQ·Tag de 3.9 x 150 mm, que tuvo lugar a 37° C en gradiente de elusión, y la tasa de flujo fue de 1.0 ml/min. Se usaron tres eluyentes: el eluyente A fue un tampón de acetato-fosfato (Waters ACC·Tag), los eluyentes B y C fueron acetonitrilo y agua Milli-Q, respectivamente. El programa de gradiente empleado fue el siguiente: 0 min, 100% A; 0.5 min, 99% A y 1% B; 18 min, 95 % A y 5% B; 19 min, 91% A y 9% B; 29.5 min, 83% A y 17% B; 33 min, 60% B y 40% C; 36 min, 100% A, manteniendo estas condiciones durante 50 min. Los aminoácidos-AQC derivatizados fueron detectados por su fluorescencia a la excitación de 250 nm y emisión a 395 nm. Los picos de HPLC fueron identificados mediante la comparación de los datos de tiempo de retención obtenidos a partir de los estándares (Figura 70).

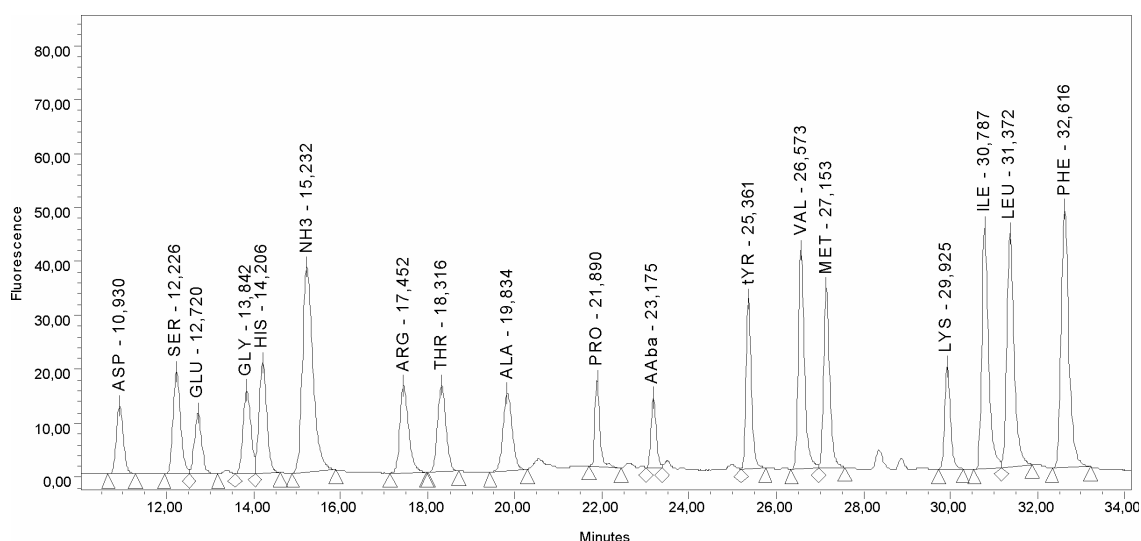


Figura 70. Cromatograma del patrón comercial. Se representan los picos de los aminoácidos analizados, así como los tiempos de retención de cada uno de ellos. Los aminoácidos se expresaron en µg/ml de medio.

9. Medida del contenido de calcio intracelular mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama.

El método de absorción atómica de llama se usó en la determinación de calcio en extractos totales de células. Las medidas se llevaron a cabo en el Servicio de Espectroscopía de Absorción Atómica de la Universidad de La

Laguna mediante un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con atomización de llama de aire/acetileno y protóxido de nitrógeno/acetileno Varian 220 FS.

La absorción atómica es una técnica ampliamente usada en la detección y determinación cuantitativa de múltiples elementos del sistema periódico. Con este método se pueden determinar metales como cadmio, calcio, cesio, cromo, cobalto, plomo, níquel, etc. Su uso se extiende a diversos campos: análisis de aguas, de suelos, bioquímica, toxicología, medicina, industria farmacéutica, industria alimenticia, industria petroquímica, etc.

Este método consiste en la determinación de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los diferentes procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados. La técnica de atomización más usada es la de absorción atómica con llama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de un llama de aire acetileno u óxido nitroso-acetileno.

9. 1. Obtención de extractos totales para la determinación de calcio intracelular mediante espectroscopia de absorción atómica.

Los cultivos se inocularon en medio YGNH a partir de precultivos, crecidos hasta saturación en YPD, a una DO_{660} de 0.075 (~ 0.28 mg de células/ml). Se recogieron aproximadamente 3 mg de células mediante filtración por vacío en filtros de membrana de 0.8 μm (Millipore, MA, EEUU). Las células se lavaron dos veces filtrando 5 ml de solución de lavado fría (MgCl_2 100 mM). Las células del filtro se resuspendieron en 5 ml de solución de lavado y se transfirieron a un nuevo filtro, realizando un último lavado. A continuación las células se resuspendieron en 5 ml de HCl 0.1 M tras lo cual se tomaron 3 alícuotas de 200 μl para la determinación de la densidad óptica de la suspensión celular. Finalmente se incubaron toda la noche con agitación suave. Las muestras se centrifugaron 7 minutos a 4863 x g (5000 rpm) para eliminar los restos

celulares y determinar el calcio en el sobrenadante. La calibración del instrumento se realizó con una curva de calibrado con las siguientes concentraciones del patrón: 0; 0.2; 0.5; 1; 2 y 3 ppm de calcio. A las soluciones de la curva de calibrado se añadió potasio para minimizar las posibles interferencias por ionización del calcio. Los valores de las medidas se expresan en nmoles de calcio/mg de células.

10. Técnicas microscópicas.

10. 1. Tinción de las vacuolas con FM4-64.

En la visualización de las vacuolas en el microscopio de epifluorescencia se usó el colorante FM4-64 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EEUU). Éste es un colorante vital de naturaleza lipofílica que se incorpora a las células mediante endocitosis y es conducido a la vacuola donde se acumula en la membrana vacuolar (Vida y Emr, 1995 (301 RM)). El procedimiento empleado en la tinción de las vacuolas consistió en la centrifugación de 5 ml de un cultivo de 2.7 unidades de DO_{660} que a continuación se resuspendieron en 330 μ l de YG al que se añadió el colorante a una concentración final de 10 μ M a partir de una disolución concentrada de 1 mM en agua. Las células se incubaron a 37° C en agitación durante 15 min y a continuación la suspensión celular se añadió a 5 ml de medio fresco precalentado a 37°C. La observación de las vacuolas se realizó después de 1.5 h de la incubación con el colorante, tiempo suficiente en que el colorante se concentra en la membrana vacuolar.

10. 2. Observación de las células en el microscopio de epifluorescencia.

En la observación de las células portadoras de la proteína verde fluorescente (GFP) o las teñidas con el colorante FM4-64 se emplearon 5 μ l del medio de cultivo que se colocaron sobre un portaobjetos para su observación directa en el microscopio. Se usó un microscopio Nikon H550S Eclipse 50i

equipado con una cámara Nikon Digital DXM 1200F (Nikon, Japón). Se usó el programa ACT-1 (Nikon, Japón) para controlar el microscopio y la cámara así como para la captura de imágenes. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Corel Photo Paint. Las células se observaron empleando un objetivo de inmersión de 100X con AN de 1.3, empleando los filtros adecuados para detectar la fluorescencia de la GFP (GFP-B, EX: 460-500, BA: 510-560) y del FM4-64 (FITC, EX: 510-560, BA: 590).

11. Técnicas relacionadas con manipulación de ácidos nucleicos.

La mayoría de las técnicas descritas a continuación están recogidas en Sambrook (2001) (302 RM).

11. 1. Extracción de DNA plasmídico bacteriano a pequeña escala (“mini-preps”).

Las minipreparaciones de ADN plasmídico se realizaron con modificaciones del protocolo descrito por Holmes y Quigley, (1981) (Colmes y Quigley, 1981 (303 RM)) y se usó principalmente en la comprobación de las construcciones de ADN. Las bacterias resultantes de las transformaciones fueron crecidas a 37° C en 2 ml de medio líquido LB con los antibióticos adecuados para la selección del plásmido. Tras la centrifugación del cultivo durante 60 s a 16060 x g (13000 rpm), se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 100 µl de tampón STET mediante vórtex y la mezcla se colocó en un baño con agua hirviendo durante 1 minuto. A continuación, y tras centrifugar durante 10 min a 16060 x g (13000 rpm), el sedimento mucoide, que contiene restos celulares y ADN cromosómico, fue eliminado con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico, presente en el sobrenadante, se precipitó durante 5 min añadiendo 200 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a la misma velocidad que en el paso anterior durante 5 min y a continuación se lavó con 1 ml de etanol al 70 % (v/v). Las muestras se centrifugaron como en el paso anterior y se eliminaron los restos de etanol

incubando los tubos a 37° C. El ADN plasmídico fue finalmente resuspendido en 20 µl de agua.

Tampón STET

Sacarosa 0.023 mM

EDTA 50 mM

Tritón X-100

Tris-HCl 50 mM pH 8

En la obtención de ADN plasmídico de mayor pureza, con calidad suficiente para llevar a cabo manipulaciones más complejas como restricciones enzimáticas, se emplearon los *kits* comerciales Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) e ilustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Reino Unido), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estos *kits* están basados en el procedimiento de lisis alcalina (Bimboim y Doly, 1979 (304 RM) 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. Finalmente el ADN se eluyó en condiciones de baja salinidad.

11. 2. Extracción de ADN total de levadura.

EL ADN genómico de levadura fue necesaria en las comprobaciones mediante PCR de las mutaciones realizadas en las cepas, hibridación y obtención de sondas, y en el subclonaje de los genes de interés. Mediante el siguiente proceso se obtuvo ADN en cantidad y calidad suficiente.

Las células crecidas hasta fase estacionaria en 5 ml de YPD a 37° C se recogieron por centrifugación a 4863 x g (5000 rpm) durante 5 min, se lavaron con 1 ml de agua MilliQ y se sedimentaron nuevamente por centrifugación. Posteriormente se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis pasando la

suspensión celular a viales de 2 ml. A continuación se añadieron bolas de vidrio de 0.5 mm de \varnothing hasta la formación de un menisco. La rotura se realizó en el FastPrep FP120 (BIONOVA) durante 20 s a una velocidad de 4 m/s. Las muestras se centrifugaron a 16060 x g (13000 rpm) durante 1 min, y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf añadiendo 100 μ l de acetato de amonio 7 M, pH 7. La mezcla se incubó a 65° C durante 5 min y luego se enfrió en hielo durante otros 5 min. La extracción se llevó a cabo añadiendo 500 μ l de cloroformo y, tras unos segundos de vórtex, se centrifugó a 16060 x g (13000 rpm) durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y al ADN se precipitó con 1 ml de isopropanol durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se recoge el precipitado mediante centrifugación a 16060 x g (13000 rpm) durante 5 min. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v) y los restos del mismo se eliminan secando los precipitados a 37° C. El ADN genómico se resuspendió en 25-50 μ l de agua MilliQ. El ADN genómico obtenido mediante este procedimiento está contaminado con ARN, el cual se elimina por adición de 0.5-1 μ l de ARNasa 10 mg/ml incubando la reacción durante 30 min a 37° C. La precipitación del ADN genómico se realizó añadiendo 100 μ l de etanol/acetato amónico 7.5 M (6:1) y posterior lavado con etanol 70% (v/v). Las centrifugaciones se realizaron a 4° C a 10580 x g (13000 rpm) durante 10 y 4 min, respectivamente. Finalmente el ADN se resuspendió en 20 μ l de agua bidestilada.

Tampón de lisis

EDTA 50 mM

SDS 1 %

Tris-HCl 100 mM pH 8

11. 3. Cuantificación del ADN.

La concentración de ADN plasmídico presente en las muestras extraídas se estimó de forma semicuantitativa mediante la comparación de la fluorescencia emitida por los marcadores de masa molecular cuyas intensidades corresponden

a cantidades conocidas de ADN. Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron exponiéndolos a luz UV (302 nm). El patrón de peso molecular utilizado de forma rutinaria fue el fago λ , digerido con la enzima de restricción *BstEII*, generando un grupo de fragmentos de 0.2 a 8.5 Kpb. En el análisis de fragmentos de ADN de pequeño tamaño el patrón usado fue el marcador de peso molecular *PCR Marker* (de 700 a 50 pb) (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EEUU).

11. 4. Precipitación de ADN.

La precipitación de ADN se realizó mediante la mezcla con acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y dos volúmenes de etanol frío a 96 % (v/v) en un volumen final de 200 μ l. El ADN se dejó precipitando 30 min a -20° C y a continuación se centrifugó a 20500 x g (15000 rpm) durante 15 min, a 4° C. El precipitado obtenido se lavó con etanol frío al 70 % (v/v) y se centrifugó nuevamente a 20500 x g (15000 rpm) durante 5 min, a 4° C. El sobrenadante se retiró y se dejó secar el precipitado a 37° C. Finalmente se resuspendió en agua bidestiliada.

12. Análisis y modificación de ADN.

12. 1. Análisis de ADN mediante electroforesis.

La separación, identificación y purificación del ADN plasmídico o del genómico de la levadura así como de los productos de PCR, se realizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

12. 1. 1. Electroforesis en geles de agarosa.

La separación de ácidos nucleicos con un tamaño comprendido entre 0.3 y 30 Kpb se realizó en geles de agarosa sumergidos en tampón TAE 1X. Los

geles se prepararon en dicho tampón a la concentración adecuada de agarosa (0.7-1%) según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar y se fundió calentándola en un microondas; posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta su gelificación. En cada pocillo del gel se aplicaron 10-20 µl de muestra mezclada con 1-2 µl de tampón de carga 10X. Las electroforesis se realizaron a una diferencia de potencial constante de 95-140 V (75 mA).

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 en la visualización de los resultados los geles se expusieron a luz ultravioleta de 302 nm. Se fotografiaron empleando los equipos de documentación *Gel Documentation System* (UVP, Upland, CA, EEUU) y ChemiDoc™ XRS Gel Documentation systems acoplado a una cámara CCD Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU) y el programa informático Bio-Rad Quantity One®. El tamaño de los fragmentos de ADN fue estimado en función de los patrones moleculares de tamaño y cantidad conocidos.

Tampón TAE 50X	Tampón de carga 10X
Tris 2 M	Glicerol 50 %
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)

12. 2. Modificación enzimática del ADN.

12. 2. 1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.

El tratamiento con endonucleasas de restricción se usó en la obtención de fragmentos a partir de los plásmidos previamente construidos y en la

linearización de ciertos plásmidos con la finalidad de dirigir su integración en el genoma de la levadura. El ADN se digirió a la temperatura requerida por la endonucleasa de restricción utilizada, en un volumen de reacción de 20-100 μl , con una concentración de DNA \cong 25-100 ng/ μl , empleando de 5 a 10 U de enzima por μg de ADN y el tampón recomendado por la casa comercial que distribuye la enzima (Roche, Promega, Takara, New England Biolabs). En ocasiones la digestión se llevó a cabo utilizando el tampón universal OPA⁺ (*One-Phor-All Buffer PLUS*, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) diluido convenientemente según la enzima utilizada. (OPA 10X: Tris-acetato 100 mM pH 7.5; acetato magnésico 100 mM y acetato potásico 500 mM).

12. 2. 2. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Una vez que el ADN fue digerido con enzimas de restricción se procedió a la separación electroforética de los fragmentos resultantes. Con el fin de obtener únicamente el fragmento de interés se extrajo directamente del soporte de agarosa la banda correspondiente al peso molecular esperado, cortando el bloque de agarosa con un bisturí estéril. A partir de ese punto la extracción del ADN se realizó según las indicaciones de los *Kits* comerciales *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemania) y *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Alemania). Estos *Kits* se fundamentan en la adsorción del ADN a una matriz y su posterior elusión en condiciones de baja salinidad o en presencia de agua bidestilada.

12. 2. 3. Relleno de extremos 3' no protuberantes.

En los casos en que fue necesario rellenar extremos 3' no protuberantes se utilizó la actividad polimerasa del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega, Madison, WI, EEUU), en presencia de los dNTPs apropiados, siguiendo las recomendaciones de la casa. Los fragmentos fueron previamente purificados utilizando los *Kits* comerciales citados en el apartado

anterior. El ADN limpio fue concentrado hasta un volumen de 10-15 μ l. La reacción de relleno se llevó a un volumen final de 20 μ l.

Reacción de relleno con <i>Klenow</i>	
ADN	1-4 μ g
Tampón de reacción <i>Klenow</i>	1X
dNTPs	40 μ M
Fragmento <i>Klenow</i> de ADN pol I	1 U/ μ g de ADN
H ₂ O	Hasta 20 μ l

La solución de dNTPs contiene 5 mM de cada uno de los desoxinucleótidos (dATP, dCT, dGTP, dTTP). La composición del tampón en las reacciones de relleno fue: Tris-HCl 0.5 M pH 7.2; MgSO₄ 100 mM, DTT 1 mM, diluyéndose 10 veces para su uso. La reacción de relleno se realizó durante 10 min incubando la mezcla a 37° C y se inactivó el fragmento *Klenow* calentándola a 75° C durante 10 min.

12. 2. 4. Defosforilación de extremos 5' de moléculas de ADN.

Con la defosforilación se eliminan los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos linealizados, impidiendo que el plásmido recircularice en ligamientos posteriores. Este paso es necesario en el proceso de construcción de plásmidos recombinantes con fragmentos de ADN de diversos orígenes. Tras el tratamiento con la endonucleasa de restricción adecuada y en algunos casos de relleno de los extremos, el plásmido a defosforilar es previamente extraído de gel siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 12.2.2. La reacción de defosforilación la desarrolló la fosfatasa alcalina termolábil, aislada de camarón (*Pandalus borealis*) (Roche, Indianápolis, IN, EEUU), que se inactivó al final del proceso a 65° C durante 15 min. La defosforilación se llevó a cabo en un volumen máximo de 10 μ l considerando las siguientes recomendaciones estándares:

- Hasta un máximo de 1 pmol de extremos 5' fosforilados (protuberantes o recesivos) se incubaron a 37° C durante 10 min con 1 unidad de fosfatasa alcalina (pmol de extremo 5' fosforilados = 2 x (ng de ADN/660 x Kpb)).

- Hasta un máximo de 0.2 pmoles de extremos 5' fosforilados romos se incubaron a 37° C durante 60 min con 1 unidad de fosfatasa alcalina.

La composición del tampón de defosforilación 10X es Tris-HCl 0.5 M pH 8.5 y MgCl₂ 50 mM. La inactivación de la enzima permitió llevar a cabo la reacción de ligamiento empleando directamente un volumen adecuado de la reacción de defosforilación, sin necesidad de eliminar la enzima.

12. 2. 5. Adición de desoxiadenosinas a extremos 3' romos de moléculas de ADN.

La adición de desoxiadenosinas se llevó a cabo con el fin de ligar fragmentos de ADN de extremos romos, fundamentalmente productos de PCR amplificados con Pfu polimerasa (la Pfu polimerasa carece de actividad transferasa terminal) con el vector pGEM-T *easy* (Promega, Madison, WI, EEUU). El clonaje en el vector pGEM-T *easy* requiere la adición de una simple desoxiadenosina (dATP) a los extremos 3' de estos fragmentos, para lo cual se requiere una polimerasa carente de actividad exonucleasa 3' → 5' y con actividad transferasa terminal, como la *Taq* polimerasa. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para llevar a cabo la reacción, empleando de 1-2 µl del producto de PCR previamente aislado de gel en un volumen total de reacción de 10 µl.

Adición de desoxiadenosinas

Producto de PCR	1-2 µl
purificado	
Tampón <i>Taq</i> polimerasa	1X
dATP	0.2 mM
<i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U

La mezcla se incubó a 70° C durante 30 min y fue empleada directamente en las reacciones de ligamiento sin necesidad de posteriores purificaciones.

12. 2. 6. Ligamiento de moléculas de ADN.

El vector y el inserto fueron digeridos y purificados de geles de agarosa en la mayoría de los subclonajes excepto en aquellos en los que el vector empleado fue el plásmido comercial pGEM-T *easy* (Promega, Madison, WI, EEUU). En este caso el vector fue usado siguiendo las recomendaciones de la casa, y el inserto, obtenido principalmente a partir de la PCR, fue previamente purificado mediante el *Kit* comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Alemania). El resto de subclonajes se llevaron a cabo usando la enzima T4 ADN-ligasa (Roche, Indianápolis, IN, EEUU) en el tampón propio de la enzima a 1X (Tris-HCl 66 mM pH 7.5; MgCl₂ 5 mM; DTT 5 mM; ATP 1 mM). El volumen final de reacción fue de 10 µl-15 µl aplicándose una relación molar vector: inserto de 1:3 para extremos cohesivos, y se realizaron relaciones 1:5 y 1:10 en el caso de extremos romos. En ligamientos de extremos cohesivos y romos la mezcla de reacción se incubó toda la noche a 4° C. La cantidad de vector empleada en las reacciones fue aproximadamente de 100-150 ng. La cantidad de enzima usada varió en función de la cantidad de ADN en la mezcla de ligamiento, así como en función del volumen de reacción (el glicerol que forma parte del tampón en el que se conserva la enzima no puede alcanzar en la mezcla de ligamiento un porcentaje final superior al 15%, de lo contrario inhibiría la reacción).

Con la mezcla del ligamiento se transformaron células competentes de *E. coli*, según se describe en el apartado 2.1. Tras la selección de los transformantes, los plásmidos construidos fueron obtenidos y analizados mediante mini-preps (ver apartado 11.1.).

12. 3. Amplificación de moléculas de ADN por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR se utilizó para amplificar un fragmento de ADN que se encuentra entre dos regiones de secuencia conocida, a partir de las cuales se diseñan dos oligonucleótidos sintéticos o cebadores que son complementarios, cada uno, a un extremo del segmento de ADN de interés. El objetivo de la PCR es incrementar el número de copias del fragmento de ADN entre las regiones delimitadas por los oligonucleótidos cebadores. Así, tras permitir la hibridación de los cebadores con el ADN desnaturalizado, se efectúa la copia de las hebras correspondientes utilizando una ADN polimerasa y los cuatro desoxinucleósido trifosfato. Las moléculas de ADN bicatenario generadas son desnaturalizadas e hibridadas cíclicamente con los cebadores y la reacción de polimerización se repite un número determinado de ciclos subsiguientes.

En este trabajo la PCR ha sido utilizada con distintos fines: obtención de fragmentos de ADN en la construcción de plásmidos, identificación de clones de bacterias y levaduras que portan fragmentos de ADN de interés, obtención de sondas, determinación de la orientación del inserto en un plásmido, obtención de fragmentos de ADN para transformar levaduras y confirmación de la interrupción de una secuencia génica en levaduras.

12. 3. 1. PCR a partir de ADN purificado.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml en volúmenes que oscilaron de 20 a 100 μ l. Los componentes y concentraciones se indican a continuación:

Mezcla de reacción de PCR

ADN molde	5 ng de ADN plasmídico 100 ng de ADN genómico
Oligonucleótido <i>forward</i>	0.5 μ M
Oligonucleótido <i>reverse</i>	0.5 μ M
Tampón <i>Taq</i> polimerasa	1X
dNTPs	0.2 mM
<i>Taq</i> polimerasa	0.8-1.2 U

Las moléculas de ADN molde estaban disueltas en agua bidestilada. Los cebadores usados en este trabajo encuentran recogidos en el apéndice III. En su diseño se tuvo en cuenta que no existiera complementariedad en los extremos 3' de cada pareja, evitando así la formación de dímeros de cebadores, y además, que sus secuencias no generasen apareamientos intramoleculares, que evitan la amplificación deseada. Además se procuró que los cebadores empleados en este trabajo poseyeran una T_m similar. El diseño de los oligonucleótidos se realizó a través del programa de la base de datos de *Saccharomyces* (*Saccharomyces Genome Database*: <http://genome-www.stanford-edu/saccharomyces>). La mezcla de dNTPs se preparó a una concentración final de 5 mM para cada uno de los desoxinucleótidos. Las condiciones en las que se desarrolló la reacción de amplificación se describen en la tabla 10.

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94° C	1.5 min	
94° C	30 s	30
T ^a anillamiento ¹	30 s	
72° C	Tiempo de extensión ²	
72° C	5-10 min	

¹ T^aanillamiento, generalmente 5° C por debajo de la T_m de los cebadores

² Tiempo de extensión, 1 min por Kpb de ADN

Tabla 10. Condiciones para la amplificación de ADN por PCR empleando la *Taq* polimerasa.

Se usó ADN polimerasa de la casa comercial Biotools (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España) de forma rutinaria y, *Pfu* ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.) cuando fue preciso obtener copias de alta fidelidad, ya que posee actividad correctora (3'→5' exonucleasa) con una tasa de error de 6 a 100 inferior respecto de la *Taq* polimerasa. El tampón de la ADN polimerasa 10X empleado fue: Tris-HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM y MgCl₂ 20 mM y el tampón de *Pfu* polimerasa 10X fue: Tris-HCl 200 mM, pH 8.8, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, MgSO₄ 20 mM, Triton® X-100 1% y BSA-libre de nucleasa 1 mg/ml. Cuando se empleó la *Pfu* polimerasa se aumentó el número de ciclos de 30 a 35 y se aumentó a 2 min por Kpb a amplificar.

12. 3. 2. PCR en la obtención de sondas de ADN.

En la detección específica de secuencias de ADN fue necesaria la previa inmovilización de los mismos en un soporte sólido, lo que se realizó mediante la técnica del *southern blot* que consiste en la transferencia del ADN desde geles de agarosa a membranas de nylon cargadas positivamente. La detección se realizó mediante el empleo de sondas de ADN marcadas convenientemente según el procedimiento que se detalla a continuación.

12. 3. 2. 1 Marcaje no radiactivo de fragmentos de ADN mediante PCR empleados como sondas.

El ADN fue marcado enzimáticamente mediante PCR usando una mezcla de desoxinucleótidos que contiene dATP, dCTP, dGTP a una concentración de 2 mM. El dTTP se encuentra a una concentración de 1.3 mM. Por último la mezcla contiene dUTP acoplado a la molécula de digoxigenina a una concentración de 0.7 mM, digoxigenin-11-dUTP lábil álcali, (Roche, Alemania). Se comprobó si el producto de PCR se encuentra marcado, observando cierto retraso en la electroforesis al haber incorporado las moléculas

de digoxigeninas. A continuación el ADN marcado se purificó mediante el *kit* comercial *High Pure PCR Product Purification kit* (Roche, Alemania). La cantidad de sonda marcada se estimó por comparación con el *Dig-labeled control DNA* (Roche, Alemania), ADN control marcado de concentración conocida. Las sondas obtenidas se usaron en la hibridación del ADN inmovilizados sobre membranas, permitiendo su detección con anticuerpos específicos anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina, *anti-digoxigenin Fab fragments* (Roche, Alemania), a través del sistema colorimétrico NBT/BCIP o usando el sistema de detección quimioluminiscente CDP-*Star* (Roche, Alemania).

13. Southern blot.

El ADN genómico (1-2 μg) digerido con las endonucleasas de restricción adecuadas fue separado por electroforesis. La transferencia a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche, Alemania) se realizó por el método de transferencia alcalina descendente (Sambrook *et al.*, 1989). Sobre una pila de papel seco de 3-4 cm de altura se colocaron en el siguiente orden: 4-5 papeles empapados en tampón de transferencia y de tamaño igual que el gel, la membrana de nylon, el gel y 5-10 papeles de filtro empapados en tampón de transferencia que sirvieron como puente entre el depósito, conteniendo el tampón, y el gel.

Después de una hora de transferencia, la membrana se neutralizó con tampón SSC 2X durante 20 min. Tras el secado de la membrana durante 5 min a 30° C, el ADN se unió covalentemente a la membrana mediante exposición a luz ultravioleta (120 mJ/cm^2).

Tampón de transferencia	Tampón SSC 20X
NaOH 0.4 N (preparada en el momento)	NaCl 3 M
	Citrato sódico 0.3 M
	pH 7 ajustado con HCl

Las hibridaciones de ADN-ADN se realizaron según las recomendaciones de (Engler-Blum *et al.*, 1993 (374 RM)). La prehibridación e hibridación de la membrana se realizó a 42° C en presencia de formamida al 40%. Las membranas se prehibridaron al menos durante dos horas. El volumen de solución, en mililitros, empleado durante la prehibridación fue del 10% de la superficie de la membrana. Tras estas dos horas se añadió la sonda marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada por calentamiento a 100° C durante 10 min en solución de hibridación y rápido enfriamiento en un baño con etanol-hielo-agua durante 5 min. El volumen de la solución de hibridación fue del 5% de la superficie de la membrana. La hibridación se desarrolló durante toda la noche a 42° C.

Tampón de Prehibridación e Hibridación	Tampón de Bloqueo I	Tampón Maleico
SSC 5X	Agente bloqueante 10% (p/v) (Roche, Alemania)	Ácido maleico 100 mM, pH 7.5
Lauril sarcosina 0.1% (p/v)	disuelto en tampón maleico	NaCl 150 mM
SDS 0.02%		
Formamida 40%		
Tampón de bloqueo I 1.6% (v/v)		

Después de la hibridación se llevó a cabo el procedimiento de detección. Previamente la membrana se lavó una vez en condiciones de baja rigurosidad, a temperatura ambiente durante 15 min, con tampón de lavado I y dos veces en condiciones de alta rigurosidad, a 63 ° C durante 15 min, con tampón de lavado

I. Con los pasos de lavado se elimina la sonda que se ha hibridado inespecíficamente.

Tampón de lavado I

SSC 2X

SDS 0.1% (p/v)

La detección inmunológica de las bandas hibridadas se realizó mediante el sistema *DIG DNA Labelling and Detection Kit* (Roche, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El sistema está basado en el reconocimiento inmunológico de la sonda marcada con digoxigenina con el anticuerpo-DIG conjugado con fosfatasa alcalina. La visualización del resultado se llevó a cabo sobre la membrana utilizando el tampón de detección de la fosfatasa alcalina que contiene los sustratos colorimétricos NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium Salt) y BCIP (5-bromo-cloro-3-indolil-fosfato) a 5 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, y que por acción de la fosfatasa alcalina producen un precipitado coloreado sobre la membrana. También se empleó el revelado con el sustrato quimioluminiscente CDP-*Star* de la fosfatasa alcalina (Disodio 2-cloro-5-(4-metoxispiro (1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro) triciclo [3.3.1.13,7]decan)-4-il) fenil fosfato) (Roche, Alemania).

Tampón de detección de la fosfatasa alcalina	NBT	BCIP
	100 mg/ml en	50 mg/ml en
Tris-HCl 0.1 M pH 9.5	dimetilformamida 70%	dimetilformamida
	(v/v)	100% (v/v)
MgCl ₂ 0.05 M		
NaCl 0.1 M		

14. Principios de la técnica de PCR a Tiempo Real.

La PCR a tiempo real (RT-PCR) se empleó con el fin de determinar el nivel de expresión del gen en estudio bajo ciertas condiciones en las que puede modificarse su expresión génica (incremento o disminución) o permanecer constante. En este trabajo la RT-PCR se ha empleado con la finalidad de determinar si el patrón de expresión del gen *NARI* de *H. polymorpha* se modifica en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno. Es una técnica complementaria al *northern blot*, pero la precisión y cuantificación de la expresión permite diferenciar pequeñas variaciones a medida que transcurre la reacción, ya que el producto de amplificación (amplicón) se cuantifica a medida que transcurren los ciclos de la PCR.

La técnica está basada en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción; y en el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo en cada muestra.

Cuanto mayor sea el número de copias del gen de estudio al inicio, se observará antes un aumento significativo de fluorescencia. El umbral fijo de fluorescencia se establece significativamente por encima de la línea de base. El parámetro C_T (*threshold cycle*) o ciclo umbral, se define como el número de ciclo en el cual la emisión de fluorescencia excede al umbral fijado (Figura 71). En este punto en el que la fluorescencia alcanza el umbral, la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo relación lineal entre el logaritmo del cambio de la fluorescencia y el número de ciclos. Cuanto mayor es la cantidad de ADNc molde de partida menos ciclos son necesarios para que el producto de la reacción se acumule y por tanto sus valores de C_T serán menores. El C_T nos permite cuantificar el ADNc presente en la muestra y por tanto la expresión del gen que queremos estudiar bajo las condiciones deseadas, de tal forma que la

diferencia de expresión entre dos muestras viene determinada por las diferencias entre sus C_T . La señal de fluorescencia es medida a tiempo real durante el transcurso de la reacción y es digitalizada y transformada en un valor numérico que corresponde al valor de C_T para cada uno de los productos amplificados.

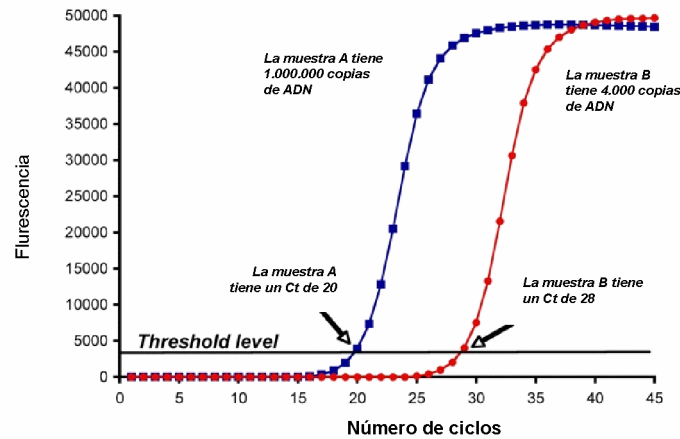


Figura 71. Detección de la fluorescencia, proporcional a la cantidad de producto amplificado. La gráfica muestra la fluorescencia emitida en cada ciclo para los diferentes productos amplificados. Existe una señal base que está por debajo del límite de detección. El umbral se fija por encima de la línea base, y se observa que cada producto amplificado sobrepasa el umbral en diferentes ciclos de PCR.

La detección de las muestras puede realizarse a través de varios reactivos fluorescentes como los agentes intercalantes fluorescentes (SYBR Green), sondas de hidrólisis (Taqman) y sondas de hibridizantes (Molecular Beacons y Scorpions). En este trabajo el fluorescente empleado fue el SYBR Green (Figura 72). Es un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena aportando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. El empleo de este fluorescente aporta una serie de ventajas: simple y económico, fácil de usar, sensible, versátil (no se necesitan sondas específicas o cebadores *ad hoc*). Pero también presenta desventajas que deben ser consideradas, ya que durante la reacción de PCR puede unirse a dímeros de oligonucleótidos y a otros productos inespecíficos, resultando en una sobreestimación de la concentración del amplicón. Por tanto, funciona muy bien para reacciones de PCR simples con oligonucleótidos que no generen amplificaciones espurias.

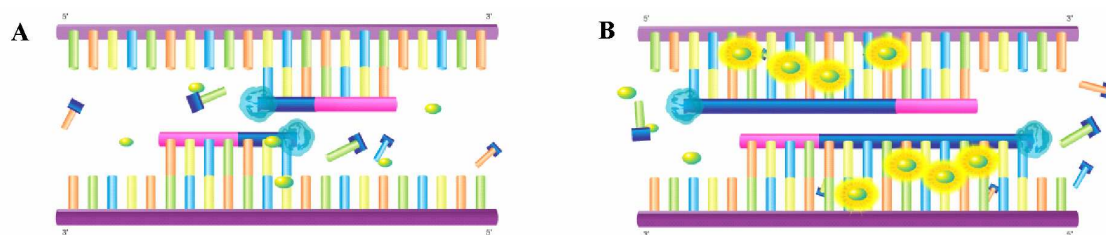


Figura 72. Esquema de unión del SYBR Green al ADN. A. El SYBR Green (en verde) se intercala en el ADN bicatenario recién sintetizado. B. La emisión de la fluorescencia es proporcional a la concentración de ADN bicatenario.

Los dímeros de cebadores y productos inespecíficos influyen en la cuantificación del producto de PCR, por lo que es necesario realizar el análisis de las curvas de disociación o “*melting point*”. Estas curvas se obtienen de la representación de la fluorescencia emitida como función de la temperatura, aportando una “curva de *melting*” para cada amplicón (Figura 73). Así podemos diferenciar un único pico en torno al valor de temperatura que se corresponde con la T_m del producto esperado. De tal forma que si se observan picos secundarios estaríamos ante la producción de productos inespecíficos.

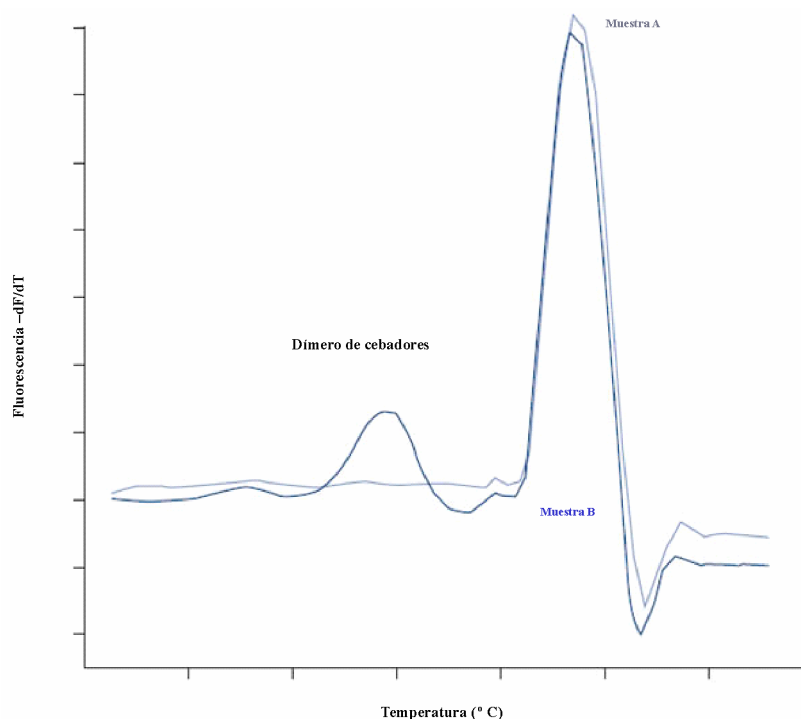


Figura 73. Análisis de la curva de fusión de 2 muestras (A y B). La muestra A sólo produce un pico resultante del producto de amplificación específica. El ejemplo B muestra un pico de un producto específico, y un pico a una temperatura correspondiente a la amplificación de dímeros de cebadores.

14. 1. Cuantificación de la expresión génica en la PCR a tiempo real.

Los datos obtenidos después de la PCR a tiempo real pueden ser analizados a través de dos métodos de cuantificación:

Cuantificación absoluta: se determina el número de copias del amplicón de interés relacionando la señal de PCR con una curva de calibración.

Cuantificación relativa: se determina como la expresión relativa del gen diana *versus* un gen de referencia o “*housekeeping gene*”. Este segundo método es el elegido en la determinación de la expresión génica de *HpNARI* en presencia de nitrato.

Las diferencias en los niveles de expresión entre el gen de estudio y el gen de referencia pueden verse afectadas por diferencias en la eficiencia de la síntesis de ADNc entre las dos muestras, lo que origina variación en el ADN que será empleado como molde en las reacciones de PCR a tiempo real. Estas diferencias se traducen en distintos valores de C_T , que no reflejan las diferencias de expresión entre las dos muestras. La corrección de estas variaciones experimentales se consigue mediante normalización con respecto a un control interno. Ese control interno es un gen de referencia endógeno cuyo nivel de expresión no se ve afectado por el tratamiento experimental. Cuanto más abundante y constante sea la expresión del control interno mejor resulta la comparación de la expresión relativa de los genes de estudio. Los genes de referencia más comúnmente empleados como control interno son GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), 18S RNA, tubulina, EF1 α , poliubiquitinas y la β -actina. En este trabajo usamos este último como gen de referencia.

14. 2. Método de análisis aplicado a la estimación relativa de la expresión génica.

Hay varias estrategias que permiten cuantificar de forma relativa la expresión de un gen. Entre ellas comentaremos dos métodos, uno de ellos el denominado método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$) y el estándar relativo.

El método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$), desarrollado por Schmittgen y Livak (2008) (330 RM), permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen, sin usar curvas estándar, ya que los niveles de expresión se relativizan frente a un gen de referencia endógeno. Sin embargo para que el método pueda aplicarse, la dinámica de amplificación del gen diana y del gen de referencia endógeno debe ser muy similar. Este método asume que las eficiencias de los dos amplicones son aproximadamente iguales al 100%, es decir, que ambas reacciones de amplificación se llevan a cabo de forma igualmente eficiente en el rango de cantidades iniciales de molde.

El modelo matemático $\Delta\Delta C_T$ parte de la siguiente ecuación:

$$\text{Cambio} = [(E_{\text{diana}})^{\Delta C_T^{\text{diana}}}] / [(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_T^{\text{referencia}}}] \quad (1)$$

Donde:

E_{diana} → Eficiencia de amplificación del gen diana

$E_{\text{referencia}}$ → Eficiencia de amplificación del gen de referencia

$\Delta C_T^{\text{diana}}$ → Diferencia del gen diana en la condición control y la condición experimental

$\Delta C_T^{\text{referencia}}$ → Diferencia del gen referencia en la condición control y la condición experimental

La eficiencia de amplificación se calcula utilizando el valor de la pendiente obtenida en la curva estándar, mediante la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(1/\text{pendiente})} \quad (2)$$

Como se asume que la eficiencia de amplificación tanto en el gen de referencia como del gen diana es del 100%, el valor de la pendiente es de -3.23 y el valor de $E=2$. Reemplazando estos valores en la ecuación (1), la misma se convierte en:

$$\text{Cambio} = 2^{-\Delta(\Delta C_T)} \quad (3)$$

Donde

$$\Delta C_T = C_T \text{ diana} - C_T \text{ referencia}$$

$$\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_T \text{ muestra o condición experimental} - \Delta C_T \text{ condición control}$$

Este es un método que simplifica los cálculos que deben realizarse sobre los datos obtenidos, sin embargo en la mayoría de las amplificaciones por PCR a tiempo real, las eficiencias de amplificación varían dando valores diferentes al 100% y afectando por tanto a la cuantificación de las cantidades iniciales en diversas muestras. Por este motivo hemos empleado el método desarrollado por Pfaffl (2001).

El método del estándar relativo, o del cambio relativo de Pfaffl, presenta la ventaja frente al método descrito anteriormente de tener en cuenta la eficiencia de amplificación obtenida tanto en el gen de referencia como en el gen diana. Para esto emplea una “curva estándar relativa”, que se obtiene mediante la realización de un mínimo de cuatro diluciones seriadas de las muestras de ADNc de cada condición y la medida de la expresión de los genes de referencia y diana (Figura 74). A partir de los valores de C_T obtenidos de cada dilución se representan en referencia a la dilución correspondiente para cada gen y condición analizada. La pendiente de la recta resultante se utiliza en el cálculo de la eficiencia de amplificación mediante la ecuación (2) y el cambio relativo de expresión se calcula aplicando la ecuación (1).

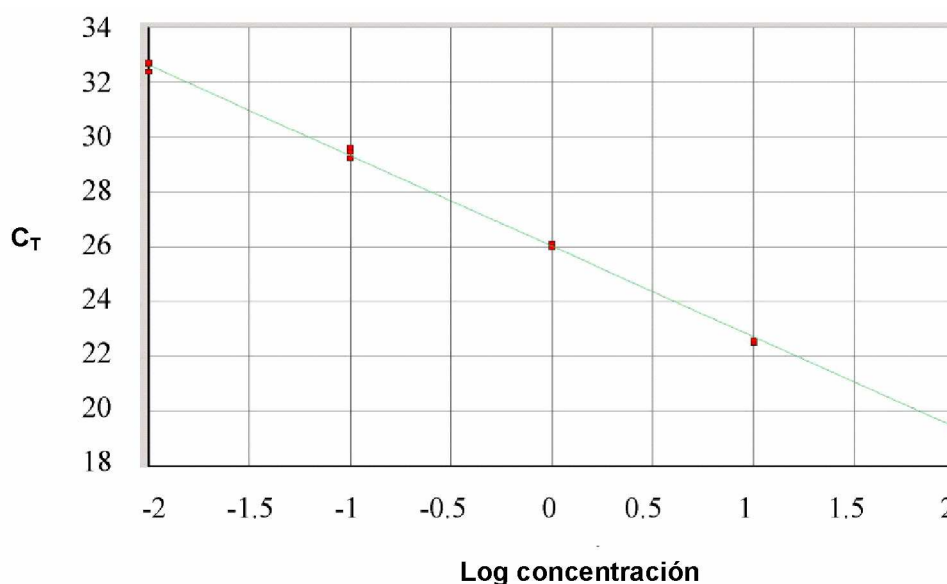


Figura 74. Curva estándar de un amplicón. La representación de los valores de C_T obtenidos para cada dilución de una muestra de ADNc de un gen respecto a la dilución correspondiente genera una recta, cuya pendiente se usa en el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen en estudio, en una determinada condición y cepa.

14. 3. Obtención del ADNc y reacción de RT-PCR.

A través de la reacción de PCR a tiempo real se realizó el estudio de la expresión de los genes *HpNAR1* y *HpCHL1* mediante la amplificación de una región concreta de su secuencia. Cada amplicón fue analizado en la cepa silvestre en dos condiciones de estudio (amonio y nitrato). El tamaño de los amplicones osciló entre 120 a 200 pb. Los cebadores empleados tienen un tamaño entre 15-20 pb. Se intentó mantener el porcentaje G/C por debajo del 70%, ya que porcentajes mayores predisponen a interacciones no específicas que pueden ser detectadas en el caso del uso de SYBR Green y reducen la eficiencia de la reacción. Además en el diseño de los cebadores se evitó que éstos formaran estructuras secundarias y la formación de dímeros. El diseño de los cebadores se realizó a través del programa Primer3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/Primer3_www.cgi).

La cepa silvestre creció en medio YGNH hasta una densidad óptica de 10 mg/ml. A continuación, las células se recogieron centrifugando el medio a 4863 x g (5000 rpm) durante 7 min. Se lavaron con agua fría y se resuspendieron en medio YGNO (conteniendo 5 mM de nitrato; condición de 210

ensayo) y en medio YGNH (conteniendo 5 mM de amonio; condición control). Se mantuvieron en agitación a 37° C durante 2 horas. Seguidamente se centrifugó el medio, se lavaron las células en las mismas condiciones que antes y se congelaron a -20° C hasta el momento de la extracción del ARN. La extracción de ARN se realizó empleando el *Kit* comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este *Kit* está basado en la utilización de una resina de intercambio iónico inmovilizada en una columna que en condiciones de alta concentración salina retiene selectivamente al ARN. Así se pueden aislar con buen rendimiento moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos.

Partiendo de 100 mg de células se procedió a la rotura mecánica mediante el empleo del homogenizador FastPrep FP120 (Q-BIOGENE, Francia). La rotura se realizó con bolas de vidrio de 0.5 mm de Ø a una velocidad de 6 m/s durante 20 s y el tampón de rotura suministrado por el *Kit*, el cual está compuesto por isotiocianato de guanidina que inactiva las RNasas. Tras la rotura las muestras se enfriaron en hielo durante 5 min, transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 2 min a 16060 x g (13000 rpm). El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf y sometido a una nueva centrifugación a 4° C, esta vez a 1500 x g durante 5 min. La adición al sobrenadante de un volumen de etanol al 70 % (v/v), aportó las condiciones apropiadas para la unión del ARN a la resina. Una vez que la mezcla fue aplicada a la columna se procedió a los lavados repetidos con un tampón de alta concentración salina que elimina los contaminantes, mientras que el ARN permanece unido a la resina. Finalmente el ARN fue obtenido tras la adición de agua libre de RNasas.

Las moléculas de ADN que pudieran estar presentes en la muestra fueron degradadas por la adición de 27 U de DNasa I (*Rnase-Free Dnase Set*, Qiagen, Alemania) por cada 10 µl del eluido durante 10 min a temperatura ambiente. Las DNasas se inactivaron tras la adición de EDTA a una concentración final de 4 mM. Para comprobar que el ADN había sido eliminado

de la muestra se realizó una PCR usando los cebadores diseñados para el gen de la actina. La ausencia de producto de PCR confirmó la pureza de las muestras.

La obtención del ADNc se llevó a cabo utilizando el *Kit* comercial *iScript* (Biorad, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los 20 μ l de muestra de la retrotranscripción fue considerada como la dilución 1/1, y a partir de ella se realizaron diluciones de 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625. De cada una de estas diluciones se emplearon 3 μ l como molde en las reacciones de amplificación a tiempo real. En la reacción de PCR a tiempo real se empleó el SYBR Green a 2X y el resto de los componentes se obtuvieron a partir del *Kit* comercial *GeneAmp Fast PCR Master Mix* (Applied Biosystems, CA, EEUU) La mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios en la reacción de PCR, excepto los cebadores específicos de cada amplicón. Los cebadores se añaden a una concentración final de 0.5 μ M a partir de una solución stock de 20 μ M. Las reacciones de PCR se realizan en placas multipocillos diseñadas para el termociclador iCycler iQ (Biorad, EEUU) y se cubren con un film óptico autoadhesivo que permite la detección de la fluorescencia emitida desde las muestras y evita su evaporación. Cada reacción se realiza en un volumen final de 20 μ l.

La reacción de amplificación se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

<i>Desnaturalización</i>	2 min	95°C	1 ciclo
<i>Amplificación y cuantificación</i>	15 segundos 20 segundos 20 segundos	95°C 60°C 72°C	40 ciclos
<i>Melting</i>	Incremento de 0.5° C/segundo	Desde 60°C a 90°C	

La determinación de la fluorescencia emitida se realizó en el paso de extensión del amplicón, es decir, en el paso de 60° C. Una vez finalizada la reacción se comprobó la ausencia de dímeros de cebadores y la especificidad de los productos de PCR mediante el análisis de las “curvas de *melting*”. La especificidad de los productos de PCR fue confirmada mediante electroforesis con la obtención de una única banda del tamaño esperado.

Se determinaron los valores de C_T para las cuatro diluciones (1/1, 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625) de cada amplicón en la condición de control y ensayo. La representación de los valores de C_T versus el logaritmo de la dilución correspondiente generó las “curvas estándar relativas” y los valores de las pendientes obtenidas fueron empleados en el cálculo de la eficiencia de amplificación de cada amplicón. El valor de $\Delta C_T^{\text{diana}}$ se calculó hallando la diferencia del C_T del gen diana en la condición control y la condición experimental para cada dilución y luego se hizo un promedio de los valores. De la misma forma se calculó el $\Delta C_T^{\text{referencia}}$ utilizando los valores de C_T obtenidos para el gen de la β -actina. Estos valores se emplearon como exponentes en la ecuación (1), lo que permitió conocer el cambio de la expresión del gen en estudio que se produce en la condición experimental (YGNO) en comparación con la condición control correspondiente (YGNH).

15. Metodología específica desarrollada en la realización de este trabajo.

15. 1. Plásmidos pNAR1 y pNAR1–PfuA.

El plásmido pNAR1 resultó del ligamiento entre el vector comercial pGEM-T *Easy* (Promega, EE.UU.), linearizado en la diana *EcoRV* del polilinker, y el fragmento de 2876 pb (788 pb antes de la ORF de *HpNAR1* y 684 pb después de la misma), obtenido por PCR de genómico con la polimerasa Taq, usando los oligos 334int-F y 334int-R. Este fragmento porta el gen que codifica la proteína Nar1. Este plásmido sirvió como base para la posterior interrupción

del gen *HpNAR1*. La construcción del plásmido pNAR1-PfuA es idéntica a la construcción del plásmido pNAR1. La diferencia entre ambos está en la enzima polimerasa empleada en la obtención del gen *HpNAR1*. En este segundo caso el gen *HpNAR1* fue obtenido mediante PCR utilizando a la polimerasa Pfu, la cual rinde copias de mayor fidelidad que las obtenidas por la polimerasa Taq. Otra diferencia es la aplicación del plásmido pNAR1-PfuA ya que se empleó en la construcción de pLEU2-NAR1-PfuA el cual se usó a su vez en la obtención de la cepa portadora de varias copias del gen *HpNAR1*.

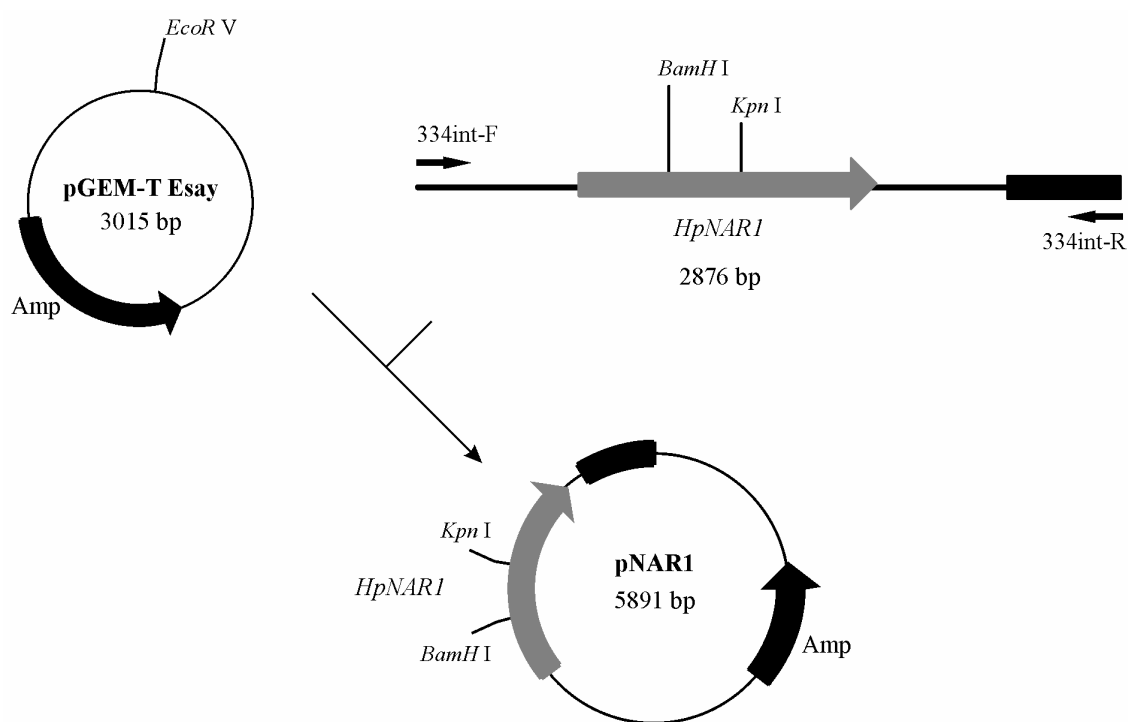


Figura 75. Esquema de la construcción del plásmido pNAR1.

15. 2. Plásmido p Δ *nar1* y p Δ *nar1*::*LEU2*

El plásmido p Δ *nar1* se construyó a partir del plásmido pNAR1 y el fragmento de 1970 pb del plásmido pBSURA3. Se realizó una deleción de 347 pb sobre el plásmido pNAR1 utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI*. Por otra parte, el plásmido pBSURA3 fue tratado con las mismas enzimas de restricción liberando el gen *HpURA3*. La inserción del gen *HpURA3* dentro del gen *NAR1* genera la interrupción del mismo. El plásmido resultante, p Δ *nar1*, tiene 7514 pb y se empleó como molde en la reacción de PCR con los oligos

334int-F y 334int-R a partir de la cual se obtuvo el fragmento de interrupción de 4499 pb, utilizado en la obtención de la cepa $\Delta nar1::URA3, leu2$.

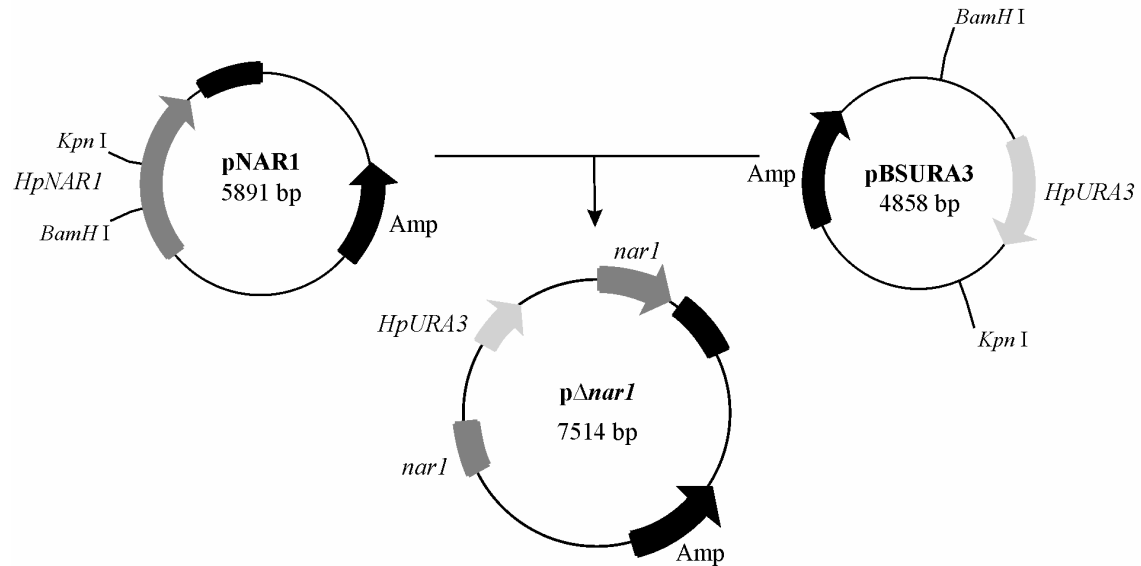


Figura 76. Esquema de la construcción del plásmido p $\Delta nar1$.

Para la obtención de los dobles mutantes $\Delta nar1\Delta yni1$ fue necesaria la interrupción del gen *HpNAR1* con el marcador *HpLEU2*. El plásmido resultante, p $\Delta nar1::LEU2$ se obtuvo a partir de los plásmidos pNAR1 y pGEMLEU2. Ambos plásmidos se digirieron con las endonucleasas *KpnI* y *BamHI*. Esta doble digestión de pNAR1 provocó la delección de 347 pb del gen *HpNAR1*. Finalmente, mediante ligamiento cohesivo con 1397 pb del fragmento obtenido de pGEMLEU2 se obtuvo el vector p $\Delta nar1::LEU2$, empleado como ADN molde en la PCR que rinde el fragmento de 3926 pb empleado en la interrupción génica. Los cebadores empleados en dicha PCR fueron 334int-F y 334int-R.

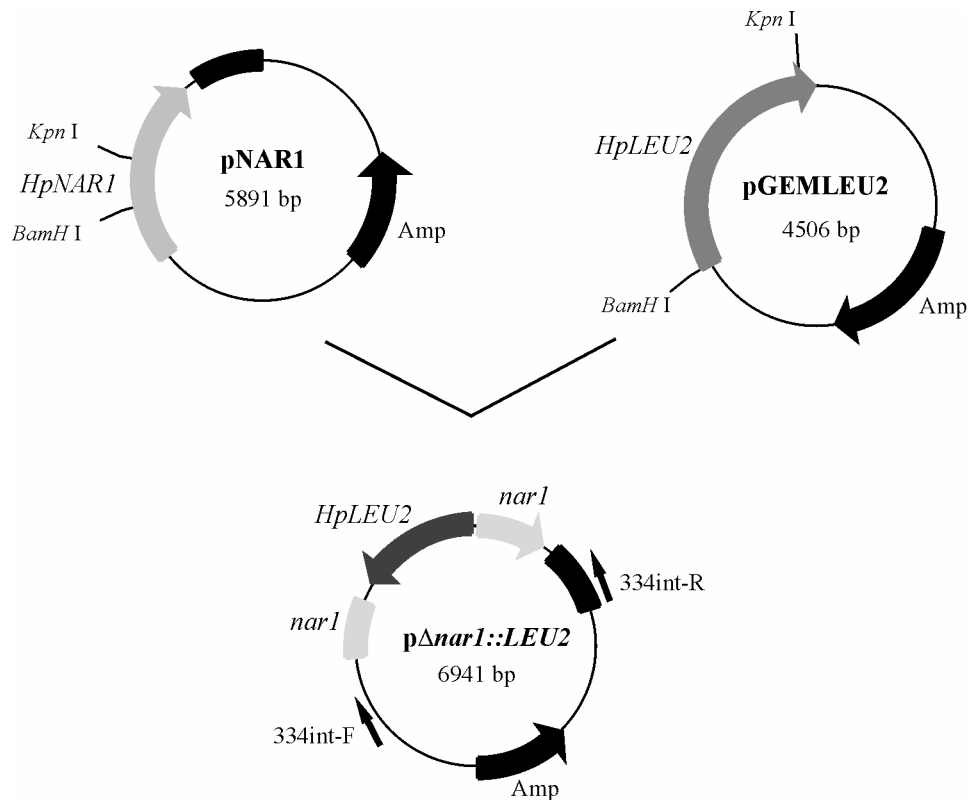


Figura 77. Esquema de la construcción del plásmido p $\Delta nar1::LEU2$.

15. 3. Plásmido pLEU2-NAR1-PfuA.

Este plásmido se obtuvo mediante ligamiento del fragmento de 2492 pb *Sal* I-*Sal* I del plásmido pNAR1-PfuA y el plásmido pGEMLEU2 digerido con la misma enzima de restricción, rindiendo el plásmido pLEU2-NAR1-PfuA de 6998 pb. Este plásmido se empleó para la sobreexpresión del gen *HpNAR1* en la cepa $\Delta nar1::URA3, leu2$, linearizando el plásmido a nivel del gen *HpLEU2* con la enzima *NarI*, favoreciendo así la integración dirigida en este gen.

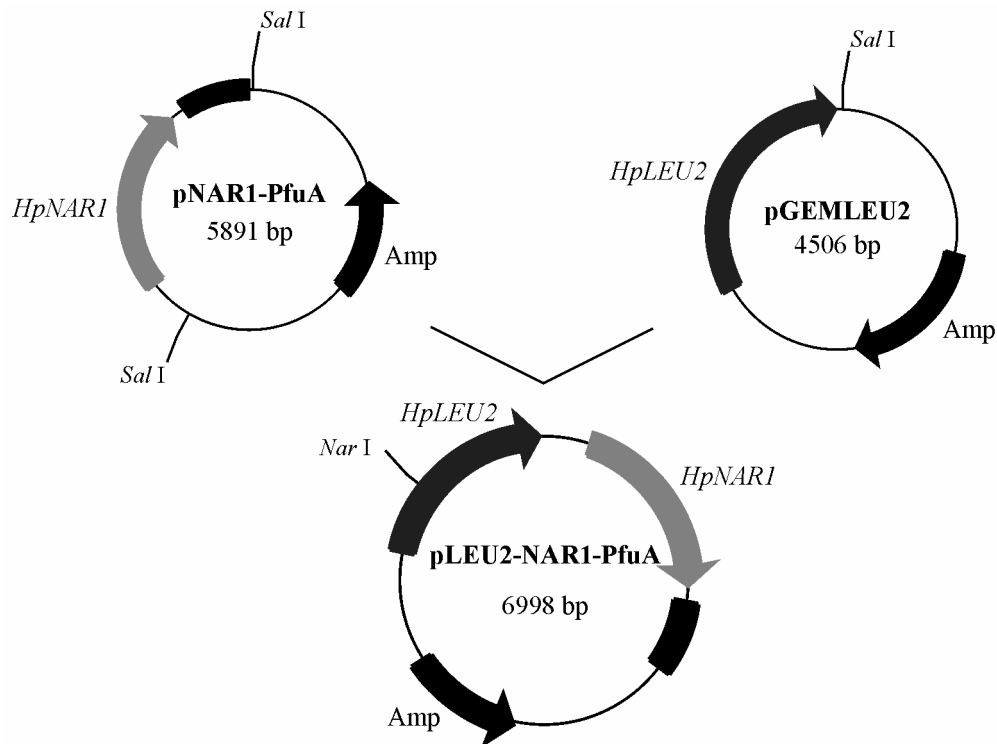


Figura 78. Esquema de la construcción del plásmido pLEU2-NAR1-PfuA.

15. 4. Plásmido pCHL1.

Este plásmido consta de un fragmento de 2728 pb (538 pb antes de la ORF y 480 pb después de la misma) correspondiente al gen *HpCHL1* obtenido por PCR de genómico, con los oligos 299int-F y 299int-R, usando Taq polimerasa, y el vector pGEM-T *Easy*. pCHL1 fue empleado como plásmido de partida para la posterior delección del gen *HpCHL1* obteniendo el plásmido p Δ chl1. La construcción del plásmido pCHL1 es idéntica a la construcción del plásmido pCHL1-PfuA. La diferencia entre ambos está en la enzima polimerasa empleada en la obtención del gen *HpCHL1*. En este segundo caso el gen *HpCHL1* fue obtenido mediante PCR utilizando a la polimerasa Pfu. Otra diferencia fue su aplicación, ya que se empleó en la obtención de la cepa portadora de varias copias del gen *HpCHL1*.

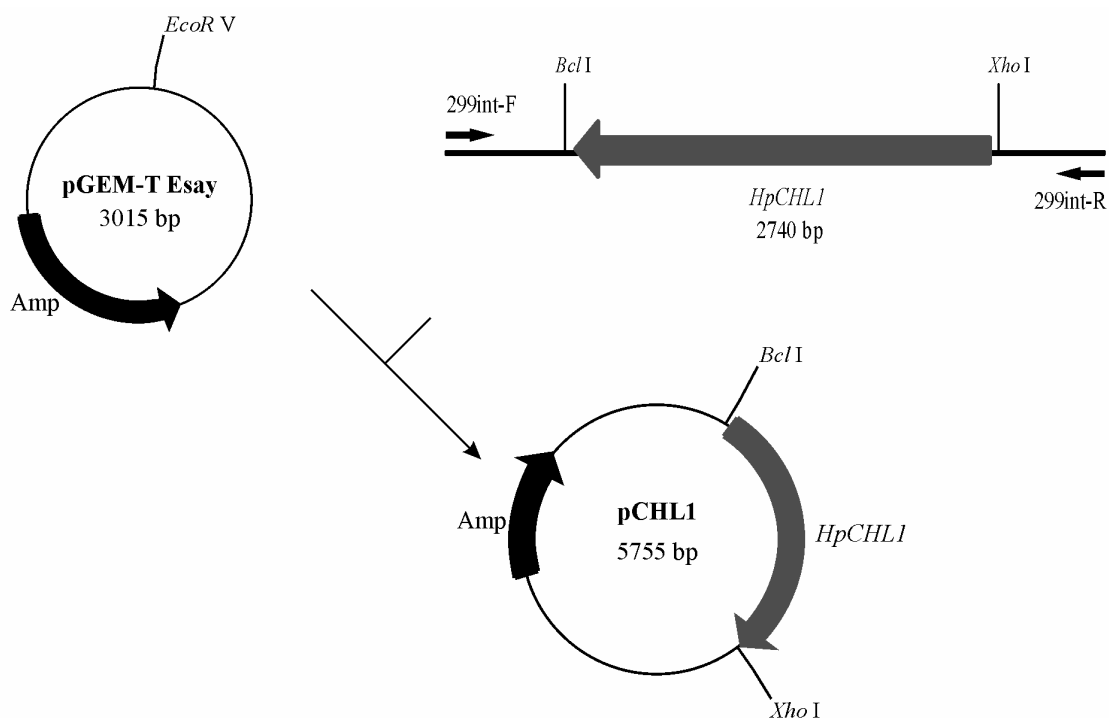


Figura 79. Esquema de la construcción del plásmido pCHL1.

15. 5. Plásmido p Δ *chl1*.

El plásmido p Δ *chl1* se obtuvo generando una deleción de 1802 pb de *HpCHL1*, digiriendo a pCHL1 con las enzimas *XhoI* y *Bc I*, y ligando un fragmento de 2908 pb del gen *HpURA3* a partir del plásmido pBSURA3, obtenido mediante digestión con las enzimas *XhoI* y *BamHI*. El plásmido resultante, de 5892 pb, se empleó como molde en la reacción de PCR con los oligos 299int-F y 299int-R, a partir de la cual se obtuvo el fragmento de interrupción de 2877 pb, utilizado en la obtención de la cepa Δ *chl1::URA3, leu2*.

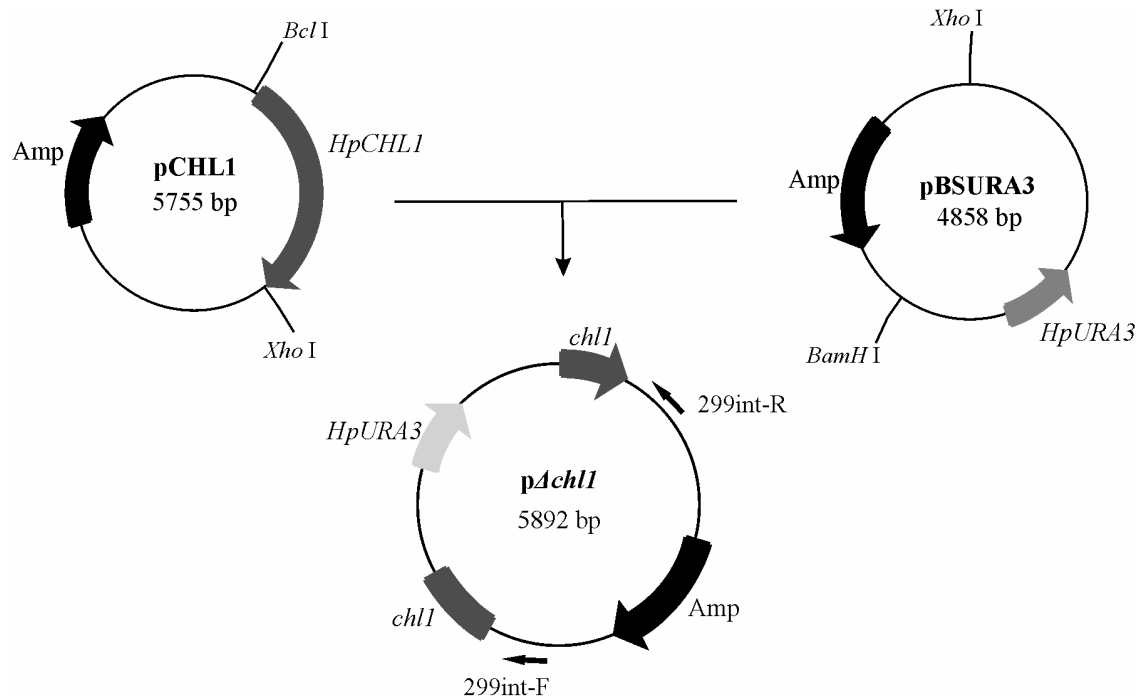


Figura 80. Esquema de la construcción del plásmido pΔchl1.

15. 6. Plásmido pLEU2-CHL1-Pfu.1.

Este plásmido se obtuvo mediante ligamiento del fragmento de 2585 pb *SalI-SalI* del plásmido pCHL1-PfuA y el plásmido pGEMLEU2 digerido con la misma enzima de restricción, rindiendo el plásmido pLEU2-CHL1-PfuA de 7092 pb. Este plásmido se usó en la sobreexpresión del gen *HpCHL1* en la cepa $\Delta chl1::URA3, leu2$. El vector se integró en el locus *HpLEU2* linealizando el vector en el gen *HpLEU2* con la enzima *BstE II*.

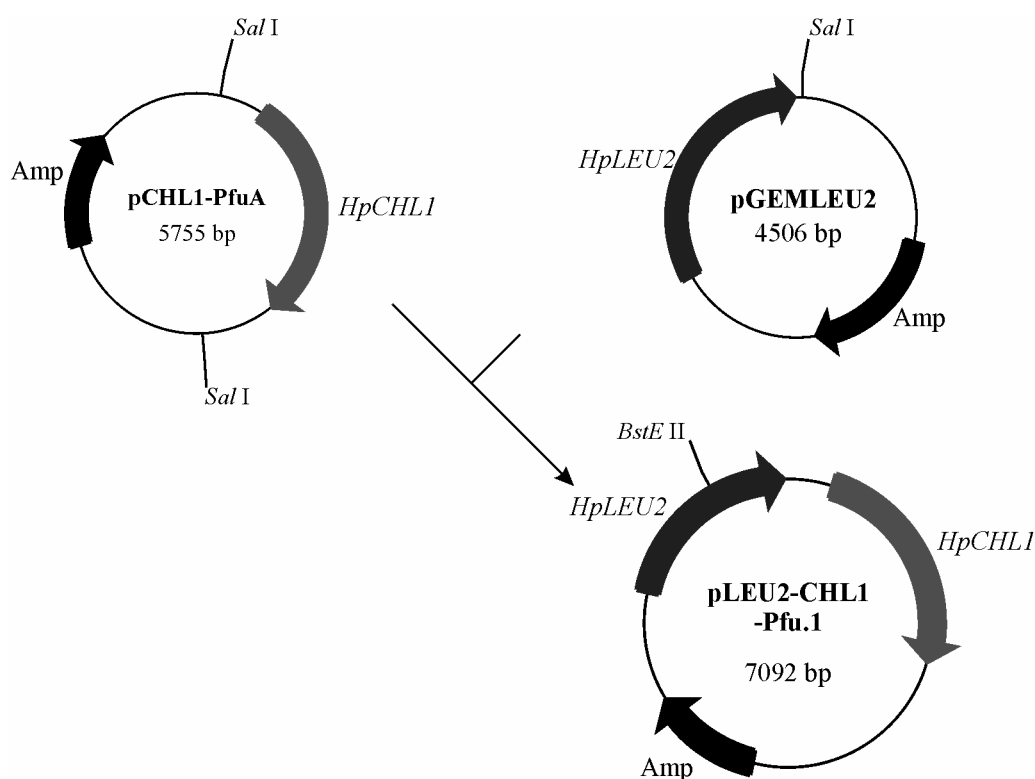


Figura 81. Esquema de la construcción del plásmido pLEU2-CHL1-Pfu.1.

15. 7. Plásmido pYNT1LEU2A.

Con el fin de construir el doble mutante $\Delta chl1\Delta ynt1$, afectado en el gen del transportador de alta afinidad, *HpYNT1*, construimos un plásmido portador de *HpYNT1* interrumpido con el gen marcador *HpLEU2*. El plásmido resultó del ligamiento de extremos romos entre pNT0 digerido en los sitios *EcoRV*, provocando una deleción de 165 pb en *HpYNT1*. El gen *HpLEU2* se obtuvo a partir de la digestión del plásmido pGEMLEU2 con el enzima *EcoRI*. Este fragmento, de 1509 pb se rellenó con el fragmento Klenow de la polimerasa, lo que aportó extremos romos necesarios en la fusión con el plásmido pNT0-*EcoRV*. La PCR sobre pYNT1LEU2A, usando los oligonucleótidos GFP-F y GFP-R rindió un fragmento de 2567 pb que se usó en la interrupción del gen *HpYNT1*.

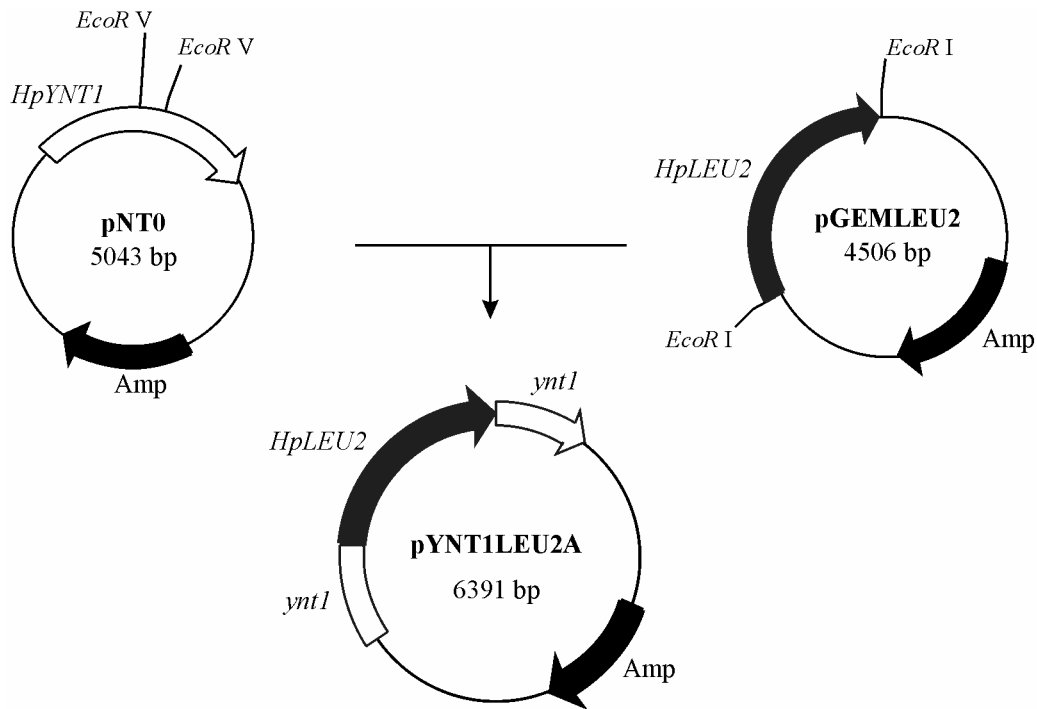


Figura 82. Esquema de la construcción del plásmido pYNT1LEU2A.

15. 8. Plásmido pNAR1-HA.

Con la finalidad de etiquetar a la proteína codificada por el gen *HpNAR1* se orientó en fase dicho gen con seis copias del epítipo HA. En la obtención del plásmido pNAR1-HA se empleó el plásmido pHA1, digerido con *HindIII* y *BglII*, y el producto de PCR de 1440 pb del gen *HpNAR1* carente del codón de parada. Los cebadores 3-F y 3-R empleados en la PCR portan en su secuencia las dianas respectivas de *HindIII* y *BglII*, permitiendo el ligamiento cohesivo y en fase entre el gen y las copias de HA. La integración dirigida de pNAR1-HA se realizó cortando el plásmido con *KpnI*, y los clones portadores de la construcción se identificaron mediante western blot empleando el anticuerpo comercial anti-HA (Roche, Alemania).

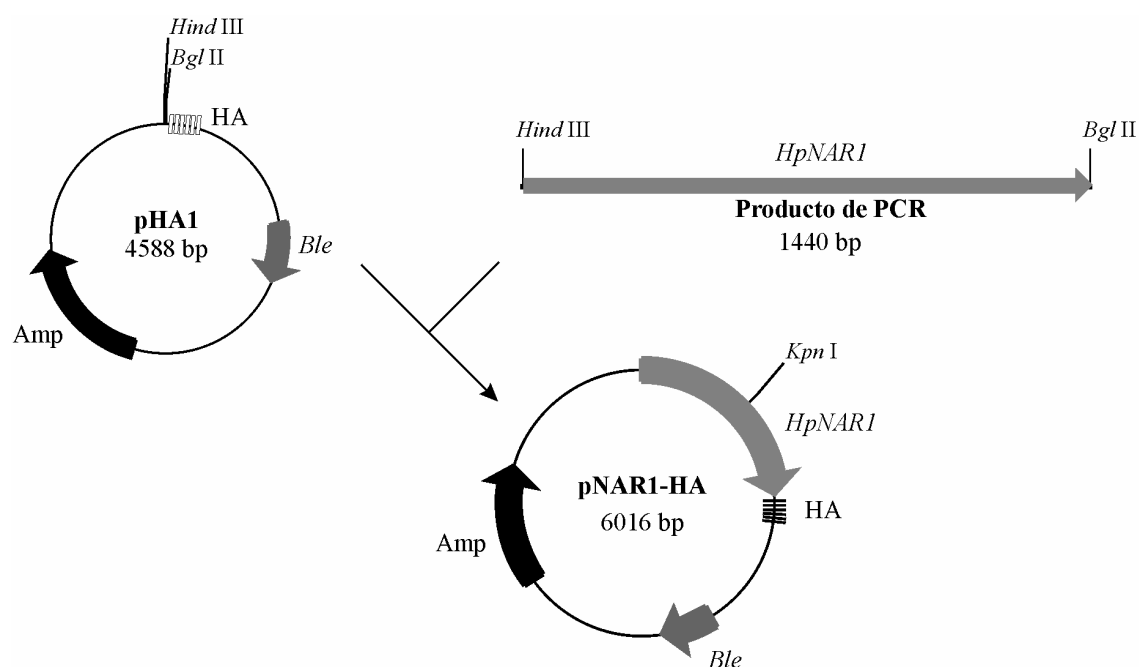


Figura 83. Esquema de la construcción del plásmido pNAR1-HA.

15. 9. Plásmido pNAR1-GFP.

Con el fin de estudiar la localización celular de la proteína Nar1 se construyó el plásmido pNAR1-GFP. Para ello se empleó el vector pANL31, portador del gen que codifica a la proteína verde fluorescente o GFP, digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bgl*II, y el producto de PCR de 1440 pb del gen *HpNAR1* carente del codón de parada. Los cebadores 3-F y 3-R empleados en la PCR portan en su secuencia las dianas respectivas de *Hind*III y *Bgl*II, permitiendo el ligamiento cohesivo y en fase entre *HpNAR1* y GFP. La integración dirigida de pNAR1-GFP digerido con *Kpn*I aportó una copia extra de *HpNAR1* y en fase con GFP. Los transformantes portadores de dicha copia se identificaron mediante western blot empleando el anticuerpo comercial anti-GFP (Roche, Alemania).

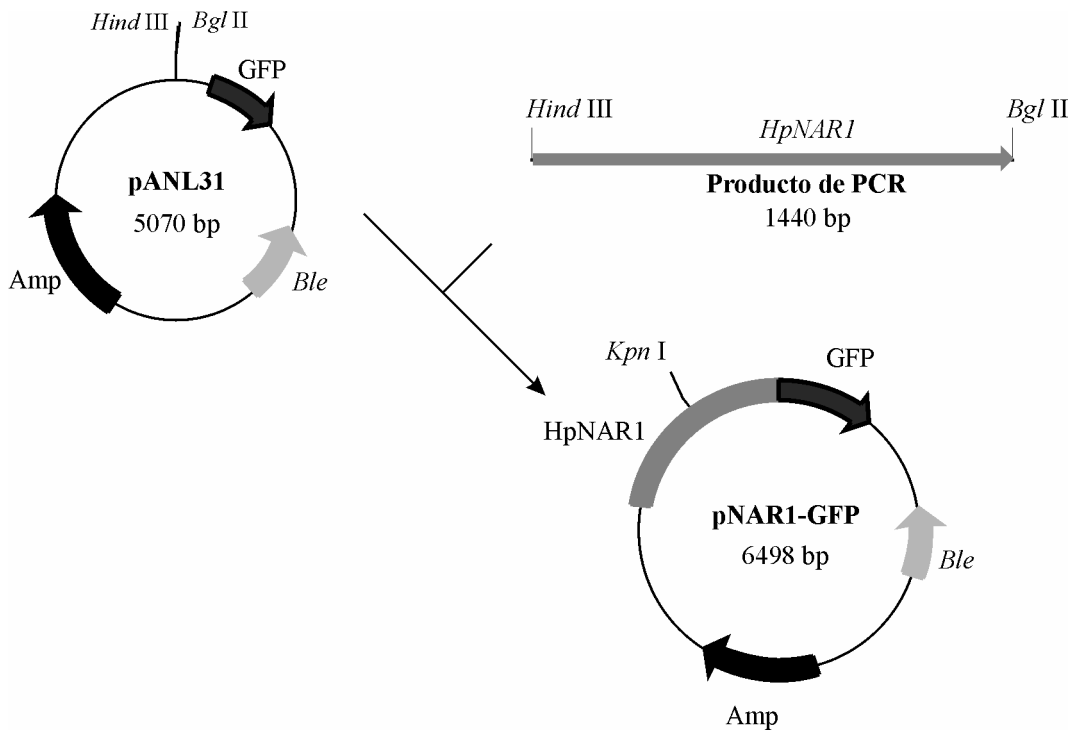


Figura 84. Esquema de la construcción del plásmido pNAR1-GFP.

15.10. Plásmido pNAR1-lac Z.

La amplificación de 931 pb del promotor de *HpNAR1* se realizó empleando la polimerasa Pfu y los cebadores proNAR1-F (con la secuencia de corte de *BamHI*) y proNAR1-r (con la secuencia de corte de *SphI*), se clonó en el vector comercial pGEM-T *Easy*, obteniendo el vector pGEM-P_{NAR1}. El fragmento correspondiente al promotor se obtuvo mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *SphI* y se clonó en el vector YEp356/LEU, cortado con las mismas enzimas, mediante ligamiento cohesivo. El plásmido resultante es pNAR1-lac Z y se linealizó con la enzima *BstEII* con el fin de dirigir la integración en el genoma.

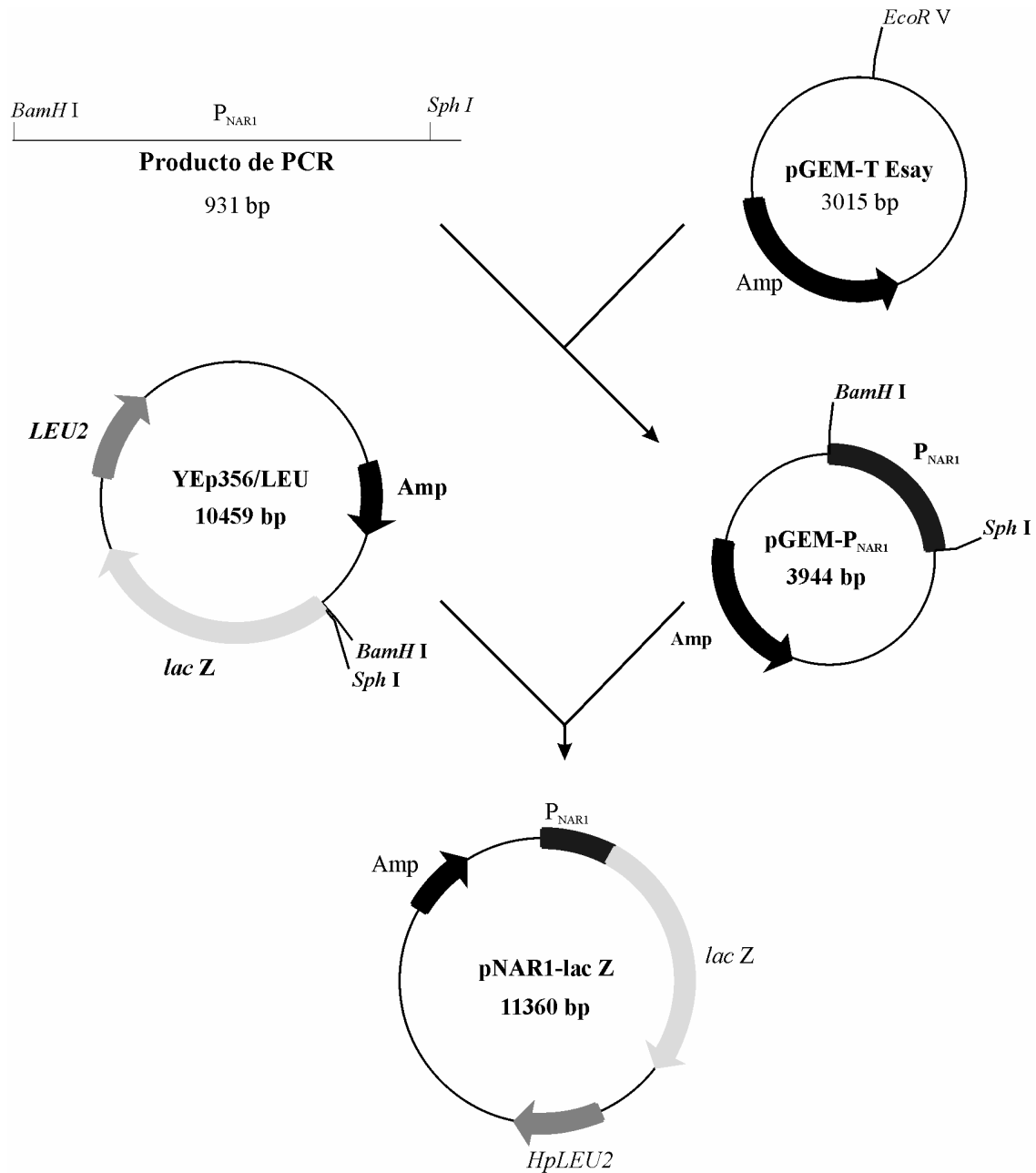


Figura 85. Esquema de la construcción del plásmido pNAR1-lac Z.

15. 11. Plásmido pNR::LEU2 y pNJ4LEU2.

Para la obtención de dobles mutantes afectados en el gen *HpYNR1* fue preciso construir un plásmido portador de la delección de dicho gen en combinación con el marcador auxotrófico *LEU2* de *H. polymorpha*. El plásmido de partida fue pNJ4A que se digirió con la enzima de restricción *Nco*I, delecionando 868 pb de *HpYNR1*. Por otra parte el plásmido pBSURA3 se trató con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bg*III obteniendo un fragmento de 1780

pb que contiene a *HpURA3*. El plásmido y el inserto se ligaron, previo tratamiento con la ADN polimerasa *klenow* obteniendo el plásmido pNR::*URA3* de 11331 pb. Este plásmido fue nuevamente digerido con la enzima *NcoI* deleccionando un fragmento de 1788 pb que contiene el gen *HpURA3*. El plásmido pGEMLEU2 se trató con *EcoRI* obteniendo un fragmento de 1509 pb. Plásmido e inserto se rellenaron y se ligaron obteniendo finalmente el plásmido pNR::*LEU2*. Este plásmido se empleó como molde de la PCR, usando como cebadores NCYC2 y NCYC1', de la que se obtuvo el fragmento de 2965 pb. La recombinación homóloga entre el producto de PCR y el ADN genómico generó la interrupción del gen *HpYNR1*. Los dobles mutantes fueron seleccionados inicialmente por su fenotipo de resistencia a clorato, y posteriormente se comprobó la interrupción génica por PCR de ADN genómico con los cebadores NCYC1 y URE2 interr F.

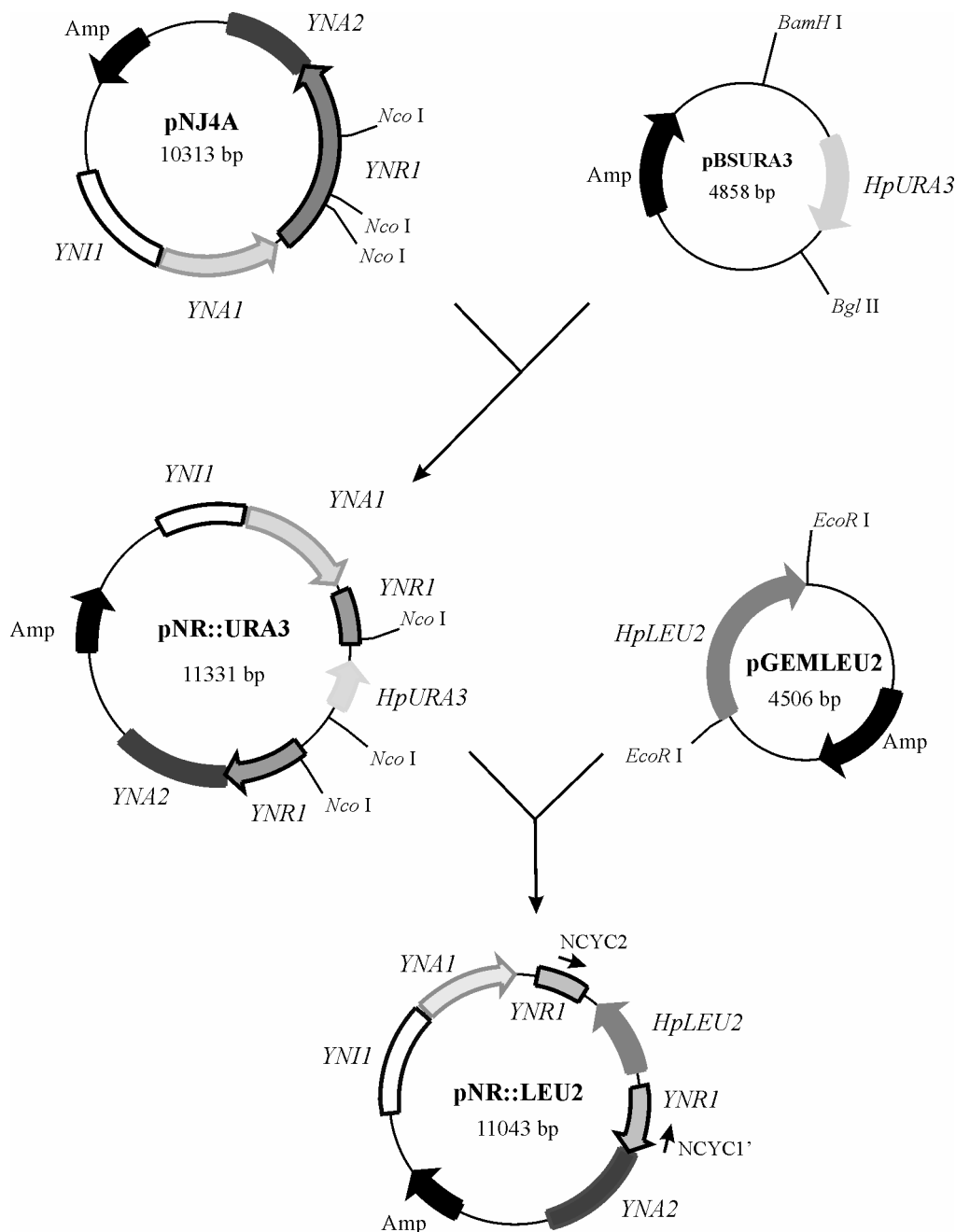


Figura 86. Esquema de la construcción del plásmido pNR::LEU2.

En la obtención de los triples mutantes se llevó a cabo la delección de 1638 pb del gen HpYNR1 (de 2577 pb) y 806 pb del HpYNA1 (de 1587 pb) mediante la digestión del plásmido pNJ4A con las enzimas de restricción NcoI y NdeI. El plásmido pGEMLEU2 fue tratado con las mismas enzimas obteniendo un fragmento de 1551 pb que contiene el gen HpLEU2. Tras el ligamiento cohesivo entre los fragmentos obtenidos se obtuvo el plásmido pNJ4ALEU2. Este plásmido se empleó como molde de la PCR a partir de la cual se obtuvo el fragmento de 3734 pb empleado en la interrupción de los genes HpYNR1 y

HpYNA1. Los cebadores utilizados fueron NCYC1' e YNI1-2F. La recombinación homóloga entre el producto de PCR y el ADN genómico generó la interrupción de ambos genes. La selección de los triples mutantes se llevó a cabo como en el caso anterior aunque en esta ocasión la comprobación mediante PCR se llevó a cabo empleando los cebadores Q-YNA2-F y URE2 interr F.

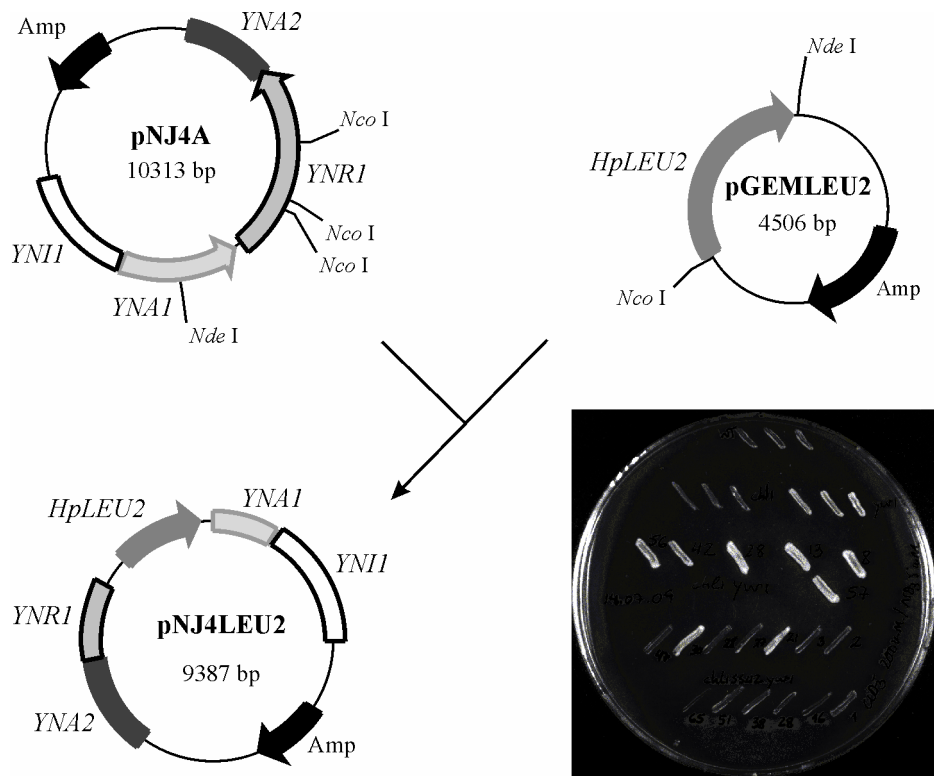


Figura 87. Esquema de la construcción del plásmido pNJ4LEU2 e identificación de clones $\Delta ynr1\Delta yna1$. Los clones de levaduras obtenidos de la transformación con pNJ4LEU2 fueron ordenados mediante estrias sobre placas con nitrato 5 mM y clorato 200 mM. Los clones se crecieron a 37 °C durante 2 días.

APÉNDICES

Apéndice I. *Cepas*

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN	OBTENCIÓN	CEPA
NCYC 495	<i>ura3, leu2</i>	GMN ¹	GMN	GMN
WT*	NCYC 495 <i>ura3::pBSURA3(URA3)</i> <i>leu2::p18B1(LEU2)</i>	GMN	GMN	GMN
Rm1	NCYC 495 <i>leu2::p18B1(LEU2)ura3</i>	GMN	GMN	GMN
WT <i>URA3</i>	NCYC 495 <i>ura3::pBSURA3(URA3)</i> <i>leu2</i>	GMN	GMN	GMN
$\Delta ynt1$	$\Delta ynt1$ <i>ura3, leu2</i> $\Delta ynt1::LEU2, URA3$	GMN Este trabajo	GMN RG49 + pBSURA3	GMN RGM06
$\Delta chl1$	$\Delta chl1::URA3, leu2$ $\Delta chl1::URA3, LEU2$	Este trabajo Este trabajo	NCYC 495 + p $\Delta chl1$ Rm1 + p $\Delta chl1$	RG50 RG51
$\Delta nar1$	$\Delta nar1::URA3, leu2$ $\Delta nar1::URA3, LEU2$	Este trabajo Este trabajo	NCYC495 + p $\Delta nar1$ Rm1 + p $\Delta nar1$	RG52 RG53
$\Delta ynt1\Delta nar1$	$\Delta ynt1::LEU2,$ $\Delta nar1::URA3$	Este trabajo	RG49 + p $\Delta nar1$	RG54
$\Delta ynt1\Delta chl1$	$\Delta chl1::URA3,$ $\Delta ynt1::LEU2$	Este trabajo	RG50 + pYNT1LEU2 A	RG55
n <i>NAR1</i>	n <i>NAR1 URA3, LEU2</i>	Este trabajo	RG52 + pLEU2- NAR1-PfuA	RG58
$\Delta nar1$ <i>P_{YNRI}-lacZ</i>	$\Delta nar1::URA3, (P_{YNRI}$ - <i>lacZ), LEU2</i>	Este trabajo	RG52 + pGP1	RG59
$\Delta chl1\Delta ssu2$	$\Delta chl1::URA3,$ $\Delta ssu2::Ble, leu2$	Este trabajo	RG50 + <i>ssu2::ble</i> de p $\Delta SSU1.2$ - BleoR	RG61
NAR1-GFP	<i>NAR1-GFP URA3,</i> <i>LEU2</i>	Este trabajo	FN1 (GMN) + pNAR1-GFP	RG62
NAR1-HA	<i>NAR1-HA URA3, LEU2</i>	Este trabajo	RG53 + pNAR1-HA	RG65

$\Delta yni1\Delta nar1$	$\Delta yni1::URA3, \Delta nar1::LEU2$	Este trabajo	FN137 (GMN) + $p\Delta nar1::LEU2$	RG67
$\Delta ynr1\Delta nar1$	$\Delta ynr1::LEU2, \Delta nar1::URA3$	Este trabajo	RG52 + $ynr1::LEU2$ de $pNR::LEU2$	RG70
WT $P_{NARI-lacZ}$	$URA3, P_{NARI-lacZ}, LEU2$	Este trabajo	WT $URA3$ + $pNAR1-lacZ$	RG71
RG73	$\Delta chl1::URA3 \Delta[yna1, ynr1]::LEU2$	Este trabajo	RG50 + $ynr1::LEU2$ de $pNJ4LEU2$	RG73
RG74	$\Delta chl1::URA3, \Delta ssu2::ble \Delta[yna1, ynr1]::LEU2$	Este trabajo	RG61 + $ynr1::LEU2$ de $pNJ4LEU2$	RG74
$\Delta chl1 P_{YNRI-lacZ}$	$\Delta chl1::URA3, P_{YNRI-lacZ} LEU2$	Este trabajo	RG50 + $pGP1$	RG75
FN3203	$\Delta ynt1::ura3$ $\Delta ynr1::URA3$ $leu2::pGP1 (P_{YNRI-lacZ} HpLEU2)$	GMN	GMN	FN3203
RG77	$\Delta chl1::URA3, \Delta ynr1::LEU2$	Este trabajo	RG50 + $ynr1::LEU2$ de $pNR::LEU2$	RG77
nCHL1	nCHL1 $URA3, LEU2$	Este trabajo	WT $URA3$ + $pLEU2-CHL1-Pfu.1$	RG78
$\Delta ynr1\Delta nar1 \Delta ssu2$	$\Delta ynr1\Delta nar1\Delta ssu2$ $URA3 LEU2 ZEO$	Este trabajo	RG70 + $ssu2::ble$ de $p\Delta SSU1.2-BleoR$	RG79
WT $P_{CDRE-lacZ}$	WT $URA3 (P_{CDRE-lacZ} HpLEU2)$	GMN	GMN	CR 8001
$\Delta chl1 P_{CDRE-lacZ}$	$\Delta chl1::URA3 (P_{CDRE-lacZ} HpLEU2)$	Este trabajo	RG50 + $pAMS367LEU2$	RG83
WT $P_{ENAI-lacZ}$	WT $URA3 (P_{ENAI-lacZ} HpLEU2)$	GMN	GMN	CR 4001
$\Delta ure2 P_{ENAI-lacZ}$	$\Delta ure2::URA3 (P_{ENAI-lacZ} HpLEU2)$	GMN	GMN	CR 4002

$\Delta chlI$ P _{ENAI} - <i>lacZ</i>	$\Delta chlI::URA3$ (P _{ENAI} - <i>lacZ</i> HpLEU2)	Este trabajo	RG50 + pENA1-lacZ	RG84
--------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------	-----------------	----------------------	------

¹GMN: colección del Grupo del Metabolismo del Nitrógeno.

Descripción del genotipo de las cepas bacterianas utilizadas

<i>ara</i>	Su mutación causa incapacidad para crecer con 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>endA</i>	Endonucleasa I específica de ADN. Su mutación mejora el rendimiento y calidad de los plásmidos amplificados
<i>galK</i>	La mutación confiere incapacidad para utilizar 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 <i>EcoK</i> . La mutación en este gen permite la propagación en <i>E. coli</i> de ADN procedente de otros organismos
<i>lacI</i>	Proteína represora del operón <i>lac</i> . El mutante <i>lacI^q</i> sobreexpresa el represor <i>lacI</i>
<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>lacZΔM15</i>	Mutación de <i>lacZ</i> ; deleción del dominio N-terminal de la β -D-galactosidasa que permite la complementación α por el segmento presente en pBluescript o lambda ZAP II para producir una β -D-galactosidasa funcional
<i>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 30 S del ribosoma
<i>supE</i>	Supresor de mutaciones ámbar. Algunos fagos necesitan este gen mutado para crecer
<i>Tet^r</i>	Resistencia a la tetraciclina
<i>thi-1</i>	Los mutantes requieren vitamina B1 (tiamina) para crecimiento en medio mínimo
<i>Tn10</i>	Transposón que normalmente porta el gen <i>Tet^r</i>

Apéndice II. Plásmidos

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
pGEM-T <i>Easy</i>	<i>Amp^R; lacZ</i>	Promega
pBSURA3	p BS KS(+); <i>HpURA3; Amp^R</i>	GMN ¹
pGEMLEU2	pGEM-T <i>Easy; HpLEU2; Amp^R</i>	GMN
pNAR1/pNAR1-PfuA	<i>HpNAR1; Amp^R</i>	Este trabajo
p $\Delta nar1$	$\Delta nar1::HpURA3; AmpR$	Este trabajo
p $\Delta nar1::LEU2$	$\Delta nar1::HpLEU2; AmpR$	Este trabajo
pLEU2-NAR1-PfuA	<i>HpNAR1; HpLEU2; Amp^R</i>	Este trabajo
pCHL1	<i>HpCHL1; Amp^R</i>	Este trabajo
p $\Delta chl1$	$\Delta chl1::HpURA3; AmpR$	Este trabajo
pLEU2-CHL1-Pfu.1	<i>HpCHL1; HpLEU2; Amp^R</i>	Este trabajo
pNT0	<i>HpYNT1; Amp^R</i>	GMN
pYNT1LEU2A	$\Delta ynt1::HpLEU2; AmpR$	Este trabajo
pHA1	6HA; <i>ble; Amp^R</i>	Este trabajo
pNAR1-HA	<i>HpNAR1-6HA; ble; Amp^R</i>	Este trabajo
pANL31	<i>eGFP; ble; Amp^R</i>	GMN
pNAR1-GFP	<i>HpNAR1-GFP; ble; Amp^R</i>	Este trabajo
YEp356/LEU	<i>lacZ; HpLEU2; Amp^R</i>	GMN
pGEM-P _{NAR1}	Promotor de <i>HpNAR1; Amp^R</i>	Este trabajo
pNAR1-lacZ	P _{NAR1} - <i>lacZ; HpLEU2; Amp^R</i>	Este trabajo
pNJ4A	<i>HpYNI1; HpYNA1; HpYNR1; HpYNA2; Amp^R</i>	GMN
pNR::URA3	$\Delta ynr1::HpURA3; AmpR$	Este trabajo
pNR::LEU2	$\Delta ynr1::HpLEU2; AmpR$	Este trabajo
pNJ4ALEU2	<i>HpYNI1; <math>\Delta[yna1, ynr1]; HpLEU2; HpYNA2; Amp^R</math></i>	Este trabajo

Apéndice III. Cebadores

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'	UTILIDAD
334int-F	CACATAAACGAGTACCATCCG	Amplificación de <i>HpNAR1</i>
334int-R	AACAGAATAAAGCGGCCAAG	Amplificación de <i>HpNAR1</i>
ext334	TGGATATGGGAGTGCAGAAGA	Confirmación de la interrupción de <i>HpNAR1</i>
299int-F	ATGTGTTATTCTGGCCGCTG	Amplificación de <i>HpCHL1</i>
299int-R	TCGAAGACAATCTTGGTCTCG	Amplificación de <i>HpCHL1</i>
ext299	TTCTGGTTGCTTTTGGGTGGT	Confirmación de la interrupción de <i>HpCHL1</i>
GFP-F	TACCAAGCTTCGACAAGTATGG CC	Amplificación de la secuencia de <i>HpYNT1</i> La secuencia subrayada es la diana de <i>Hind</i> III.
GFP-R	AGAGGATCCATTTTCCGCTTTC C	Amplificación de la secuencia de <i>HpYNT1</i> . La secuencia subrayada es la diana de <i>BamH</i> I
3-F	<u>AAGCTT</u> ATGGCAGATGACACAT ACTAT	Fusión del gen <i>HpNAR1</i> . La secuencia subrayada es la diana de <i>Hind</i> III
3-R	<u>AGATCT</u> ATTTGCGTCTCTCTTCT CGT	Fusión del gen <i>HpNAR1</i> . La secuencia subrayada es la diana de <i>Bgl</i> II
proNAR1-F	GGATCCCACAAAGAAGAGAAG AGACTG	Amplificación del promotor de <i>HpNAR1</i>
proNAR1-r	GCATGCAGTATGTGTCATCTGC CAT	Amplificación del promotor de <i>HpNAR1</i>
NCYC1	GCAGCAATGATACAT	Confirmación de la interrupción génica de <i>HpYNR1</i>

NCYC1'	TATCCAACCTTGCGCG	Amplificación de la secuencia de <i>ynr1::LEU2</i>
NCYC2	GAGCCGCCACTGACA	Amplificación de la secuencia de <i>ynr1::LEU2</i>
URE2 interr F	AGCTCCAGCCATTGCACG	Confirmación de la interrupción génica de <i>HpYNR1</i>
YNI1-2F	GCAAAAACGAGCTCTATTGC	Amplificación de la secuencia de <i>ynr1::LEU2</i>
Q-YNA2-F	GCAGCAGGAGCACAAACATAG	Confirmación de la interrupción génica de <i>HpYNR1</i>

Apéndice IV. Herramientas Bioinformáticas

NOMBRE	DIRECCIÓN
ABIM	http://sites.univ-provence.fr/~wabim/english/logligne.html
ABIM	http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Compute pI/Mw tool-ExPASy	http://www.expasy.org/
EMBOSS Matcher	http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/
ExPaSy	http://web.expasy.org/translate/
ExPaSy-TMpred	http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form.html
Gateway to Isoelectric Point Service	http://www3.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl
Gateway to Isoelectric Point Service	http://emblheidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk
NetPhos 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
NetPhosK 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/
NetPhosYeast 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/
OCTOPUS	http://octopus.cbr.su.se/index.php
Phosphobase	http://phospho.elm.eu.org/
Phyre ²	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/

Primer3	http://www.genome.wi.mit.edu/cgi- in/primer/Primer3_www.cgi
PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/
Saccharomyces Genome Database.	http://genome-www.stanford-edu/saccharomyces
SCPD	http://rulai.cshl.edu/SCPD/
TMRPres2D	http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adibi, S. A. (1997): The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology*, 113:332-340.
- Agaphonov, M. O., Poznyakovski, A. I., Bogdanova, A. I. y Ter-Avanesyan, M. D. (1994): Isolation and characterization of the *LEU2* gene of *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 10:509-513.
- Alifano, P., Fani, R., Liò, P., Lazcano, A., Bazzicalupo, M., Carlomagno, M. S. y Bruni, C. B. (1996): Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiological reviews*, 60:44-69.
- Amin, J., Ananthan, J. y Voellmy, R. (1988): Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.*, 8:3761-3769.
- Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A. y Hynes, M. J. (1998): Characterization of the *Aspergillus nidulans nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.*, 180:1973-1977.
- Ariño, J. (2010): Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 14:517-523.
- Arndt, K. y Fink, G. R. (1986): GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:8516-8520.
- Aslam, M., Travis, R. y Huffaker, R. C. (1993): Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction systems by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 102:811-819.

- Aslam, M., Travis, R. L. y Huffaker, R. C. (1992): Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 99:1124-1133.
- Aslam, M., Travis, R. L. y Rains, W. (1996): Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. *Plant Physiol.*, 112:1167-1175.
- Attfield, P. (1997): Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 15:1351-1357.
- Ávila, J., González, C., Brito, N., Machín, F., Pérez, M. D. y Siverio, J. M. (2002): A second Zn(II)₂Cys₆ transcriptional factor encoded by the *YNA2* gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 19:537-544.
- Ávila, J., González, C., Brito, N. y Siverio, J. M. (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. *Biochemical Journal*, 335:647-652.
- Ávila, J., Pérez, M. D., Brito, N., González, C. y Siverio, J. M. (1995): Cloning and disruption of the *YNRI* gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Letters*, 366:137-142.
- Barbara, K. E., Haley, T. M., Willis, K. A. y Santangelo, G. M. (2007): The transcription factor Gcr1 stimulates cell growth by participating in nutrient-responsive gene expression on a global level. *Mol. Genet. Genomics*, 277:171-188.

- Beck, T. y Hall, M. N. (1999): The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402:689-692.
- Beck, T., Schmelzer, A. y Hall, M. N. (1999): Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 146:1227-1237.
- Beckham, K. S. H., Potter, J. A. y Unkles, S. E. (2010): Formate-nitrite transporters: Optimisation of expression, purification and analysis of prokaryotic and eukaryotic representatives. *Protein Expression and Purification*, 71:184-189.
- Belinchón, M. M. y Gancedo, J. M. (2007): Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. *FEMS Yeast Research*, 7:40-47.
- Bell, L. C., Page, M. D., Berks, B. C., Richardson, D. J. y Ferguson, S. J. (1993): Insertion of transposon Tn5 into a structural gene of the membrane-bound nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha* results in anaerobic overexpression of periplasmic nitrate reductase activity. *Journal of General Microbiology*, 139:3205-3214.
- Bimboim, H. C. y Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7:1513-1523.
- Björne, H. H., Petersson, J., Phillipson, M., Weitzberg, E., Holm, L. y Lundberg, J. O. (2004): Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *The Journal of clinical investigation*, 113:106-114.
- Bonilla, M. y Cunningham, K. W. (2003): Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of

- endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 14:4296-4305.
- Bonilla, M., Nastase, K. K. y Cunningham, K. W. (2002): Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J*, 21:2343-2353.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Breteler, H. y Nissen, P. (1982): Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiol.*, 70:754-759.
- Brito, N., Ávila, J., Pérez, M. D., González, C. y Siverio, J. M. (1996): The genes *YNII* and *YNRI*, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha*, are clustered and coordinately regulated. *Biochemical Journal*, 317:89-95.
- Brito, N., Pérez, M. D., Perdomo, G., González, C., García-Lugo, P. y Siverio, J. M. (1999): A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct *lacZ* fusions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53:23-29.
- Byrd, C., Turner, G. C. y Varshavsky, A. (1998): The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. *EMBO J*, 17:269-277.
- Cai, H., Kauffman, S., Naider, F. y Becker, J. M. (2006): Genomewide screen reveals a wide regulatory network for di/tripeptide utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 172:1459-1476.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N. y Falkowski, P. G. (2010): The evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science*, 330:192-196.

- Carbrey, J. M. y Agre, P. (2009): Discovery of the aquaporins and development of the field aquaporins. . *Handbook of Experimental Pharmacology*, 190:3-28.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. y Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802-805.
- Challis, B. C. y Kyrtopoulos, S. A. (1977): Rapid formation of carcinogenic N-nitrosamines in aqueous alkaline solutions. *British Journal of Cancer*, 35:693-696.
- Chang, A. y Slayman, C. W. (1991): Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *The Journal of Cell Biology*, 115:289-295.
- Chatterjee, M. T., Khalawan, S. A. y Curran, B. P. G. (2000): Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology*, 146:877-884.
- Chiang, C. S., Stacey, G. y Tsay, Y.-F. (2004): Mechanisms and functional properties of two peptide transporters, AtPTR2 and fPTR2. *J. Biol. Chem.*, 279:30150-30157.
- Chiang, T. Y. y Marzluf, G. A. (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*. *Journal of Bacteriology*, 177:6093-6099.
- Chiu, C. C., Lin, C. S., Hsia, A. P., Su, R. C., Lin, H. L. y Tsay, Y. F. (2004): Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol.*, 45:1139-1148.

- Clegg, S., Yu, F., Griffiths, L. y Cole, J. A. (2002): The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Molecular Microbiology*, 44:143-155.
- Clegg, S. J., Jia, W. y Cole, J. A. (2006): Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. *Microbiology*, 152:2091-2100.
- Coffman, J. A., Rai, R., Cunningham, T., Svetlov, V. y Cooper, T. G. (1996): Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 16:847-858.
- Coffman, J. A., Rai, R., Loprete, D. M., Cunningham, T., Svetlov, V. y Cooper, T. G. (1997): Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 179:3416-3429.
- Cole, J. (1996): Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiology Letters*, 136:1-11.
- 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 Microbiology Reviews*, 26:223-238.
- Cox, K. H., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J. R., Coffman, J. A. y Cooper, T. G. (2000): *Saccharomyces cerevisiae* GATA Sequences Function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J. Biol. Chem.*, 275:17611-17618.

- Crawford, N. M. y Glass, A. D. M. (1998): Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *TRENDS in Plant Science*, 3:389-395.
- Crespo, J. L., Daicho, K., Ushimaru, T. y Hall, M. N. (2001): The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 276:34441-34444.
- Crespo, J. L. y Hall, M. N. (2002): Elucidating TOR signaling and rapamycin action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66:579-591.
- Cunningham, K. W. y Fink, G. R. (1996): Calcineurin inhibits VCX1-dependent H^+/Ca^{2+} exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 16:2226-2237.
- Cunningham, T. S., Andhare, R. y Cooper, T. G. (2000): Nitrogen catabolite repression of DAL80 expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 275:14408-14414.
- Cunningham, T. S. y Cooper, T. G. (1991): Expression of the DAL80 gene, whose product is homologous to the GATA factors and is a negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression. *Mol. Cell. Biol.*, 11:6205-6215.
- Cyert, M., Kunisawa, R., Kaim, D. y Thorner, J. (1991): Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:7376-7380.
- Cyert, M. y Thorner, J. (1992): Regulatory subunit (*CNB1* gene product) of yeast Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is

- required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell. Biol.*, 12:3460-3469.
- Cyert, M. S. (2003): Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311:1143-1150.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. y Milzani, A. (2006): Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem*, 52:601-623.
- Daniel-Vedele, F., Filleur, S. y Caboche, M. (1998): Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1:235-239.
- Deane-Drummond, C. E. y Glass, A. D. M. (1983): Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^{-1}$. *Plant Physiol.*, 73:100-104.
- Deloménie, C., Foti, E., Floch, E., Diderot, V., Porquet, D., Dupuy, C. y Bonaly, J. (2007): A new homolog of FocA transporters identified in cadmium-resistant *Euglena gracilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358:455-461.
- Deminoff, S. J. y Santangelo, G. M. (2001): Rap1p Requires Gcr1p and Gcr2p homodimers to activate ribosomal protein and glycolytic genes, respectively. *Genetics*, 158:133-143.
- DeMoss, J. A. y Hsu, P. Y. (1991): NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173:3303-3310.
- Denis, C. L. y Young, E. T. (1983): Isolation and characterization of the positive regulatory gene *ADR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 3:360-370.

- Di Como, C. J. y Arndt, K. T. (1996): Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development*, 10:1904-1916.
- Didion, T., Regenber, B., Jorgensen, M. U., Kielland-Brandt, M. C. y Andersen, H. A. (1998): The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 27:643-650.
- Dietrich, D., Hammes, U., Thor, K., Suter-Grotemeyer, M., Flückiger, R., Slusarenko, A. J., Ward, J. M. y Rentsch, D. (2009): AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 40:488-499.
- Donaton, M. C. V., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J. y Thevelein, J. M. (2003): The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 50:911-929.
- Doyle, M. P., Pickering, R. A., DeWeert, T. M., Hoekstra, J. W. y Pater, D. (1981): Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J. Biol. Chem.*, 256:12393-12398.
- Eastmond, D. L. y Nelson, H. C. M. (2006): Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *J. Biol. Chem.*, 281:32909-32921.
- Eng, W., Faucette, L., McLaughlin, M. M., Cafferkey, R. K., Morris, R. A., Young, P. R., Johnson, R. K. y Livi, G. P. (1994): The yeast *FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer

FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene*, 151:61-71.

Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. y Müller, G. A. (1993): Reduction of background problems in nonradiative northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Analytical Biochemistry*, 210, 235-244.

Eraso, P. y Gancedo, C. (1987): Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 224, 187-192.

Faber, K. N., Haima, P., Harder, W., Veenhuis, M. y Ab, G. (1994). Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Current Genetics*, 25, 305-310.

Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B. y Sawers, R. G. (2010): Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli*: a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 303:69-75.

Farcasanu, I. C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Nishiyama, F. y Miyakawa, T. (1995): Protein phosphatase 2B of *Saccharomyces cerevisiae* is required for tolerance to manganese, in blocking the entry of ions into the cells. *European Journal of Biochemistry*, 232:712-717.

Fei, Y. J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F. H., Romero, M. F., Singh, S. K., Boron, W. F. y Hediger, M. A. (1994): Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, 368:563-566.

Fernández, E. y Galván, A. (2007): Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.*, 58:2279-2287.

- Fitzgibbon, G. J., Morozov, I. Y., Jones, M. G. y Caddick, M. X. (2005): Genetic analysis of the TOR pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 4:1595-1598.
- Forde, B. G. (2000): Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465:219-235.
- Forsberg, H., Gilstring, C. F., Zargari, A., Martínez, P. y Ljungdahl, P. O. (2001): The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Molecular Microbiology*, 42:215-228.
- Forsberg, H. y Ljungdahl, P. O. (2001): Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.*, 21:814-826.
- Forsberg, H. y Ljungdahl, P. O. (2001): Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 40:91-109.
- Fraisier, V., Gojon, A., Tillard, P. y Daniel-Vedele, F. (2000): Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *The Plant Journal*, 23:489-496.
- Franzén, L. G., Rochaix, J. D. y von Heijne, G. (1990): Chloroplast transit peptides from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS Letters*, 260:165-168.
- Frommer, W. B., Hummel, S. y Rentsch, D. (1994): Cloning of an *Arabidopsis* histidine transporting protein related to nitrate and peptide transporters. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 347:185-189.

- Galván, A. y Fernández, E. (2001): Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58:225-233.
- Galván, A., Quesada, A. y Fernández, E. (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.
- Galván, A., Rexach, J., Mariscal, V. y Fernández, E. (2002): Nitrite transport to the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*: molecular evidence for a regulated process. *J. Exp. Bot.*, 53:845-853.
- Gao-Rubinelli, F. y Marzluf, G. A. (2004): Identification and characterization of a nitrate transporter gene in *Neurospora crassa*. *Biochemical Genetics*, 42:21-34.
- Garrett-Engle, P., Moilanen, B. y Cyert, M. S. (1995): Calcineurin, the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H^{+} -ATPase. *Mol. Cell. Biol.*, 15:4103-4114.
- Georgiev, V. St. (2000): Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Current Drug Targets*, 1:261-284.
- Giots, F., Donaton, M. C. V. y Thevelein, J. M. (2003): Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 47:1163-1181.
- González, C., González, G., Ávila, J., Pérez, M. D., Brito, N. y Siverio, J. M. (1994): Nitrite causes reversible inactivation of nitrate reductase in the yeast *Hansenula anomala*. *Microbiology*, 140:2633-2637.

- Goodell, E. W. y Higgins, C. F. (1987): Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 169:3861-3865.
- Grigoriev, I. V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., Kuo, A., Minovitsky, S., Nikitin, R., Ohm, R. A., Otilar, R., Poliakov, A., Ratnere, I., Riley, R., Smirnova, T., Rokhsar, D. y Dubchak, I. (2011): The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucl.Acids Res.*, 1-7.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M. y Losada, M. (1981): The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 32:169-204.
- Guo, F. Q., Young, J. y Crawford, N. M. (2003): The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15:107-117.
- Guo, F. Q., Wang, R., Chen, M. y Crawford, N. M. (2001): The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHL1)* is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell Online*, 13:1761-1777.
- Guttenplan, J. B. (1987): *N*-Nitrosamines: bacterial mutagenesis and in vitro metabolism. *Mutation Research*, 186:81-134.
- Hagting, A., Kunji, E. R., Leenhouts, K. J., Poolman, B. y Konings, W. N. (1994): The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, 269:11391-11399.

- Hagting, A., Velde, J. v. d., Poolman, B. y Konings, W. N. (1997): Membrane topology of the di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, 36:6777-6785.
- Hahn, J. S., Hu, Z., Thiele, D. J. y Iyer, V. R. (2004): Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 24:5249-5256.
- Hanahan, D. (1985): Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA Cloning: a practical approach*. D.M.Glover, pp. 109-135. IRL Press, Oxford.
- Haro, R., Garcíadeblas, B. y Rodríguez-Navarro, A. (1991): A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Letters*, 291:189-191.
- Hecht, S. S. (1997): Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216:181-191.
- Hess, D. C., Lu, W., Rabinowitz, J. D. y Botstein, D. (2006): Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *Plos Biology*, 4:2012-2023.
- Higgins, C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8:67-113.
- Hinnebusch, A. G. y Natarajan, K. (2002): Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryotic Cell*, 1:22-32.
- Hinze, H. y Holzer, H. (1985): Accumulation of nitrite and sulfite in yeast cells and synergistic depletion of the intracellular ATP content. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 180:117-120.

- Hinze, H. y Holzer, H. (1986): Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Archives of microbiology*, 145:27-31.
- Hirata, D., Harada, S., Namba, H. y Miyakawa, T. (1995): Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Molecular and General Genetics*, 249:257-264.
- Holmes, D. S. y Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114(1), 193-197.
- Homann, O. R., Cai, H., Becker, J. M. y Lindquist, S. L. (2005): Harnessing natural diversity to probe metabolic pathways. *Plos Genetics*, 1:715-729.
- Huang, N. C., Chiang, C. S., Crawford, N. M. y Tsay, Y. F. (1996): *CHL1* encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *The Plant Cell*, 8:2183-2191.
- Huang, N. C., Liu, K. H., Lo, H. J. y Tsay, Y. F. (1999): Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell*, 11:1381-1392.
- Hutter, B. y Dick, T. (2000): Analysis of the dormancy-inducible *narK2* promoter in *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiology Letters*, 18:141-146.
- Hwang, C. F., Lin, Y., D'Souza, T. y Cheng, C. L. (1997): Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.*, 113:853-862.

- Iida, H., Nakamura, H., Ono, T., Okumura, M. S. y Anraku, Y. (1994): *MIDI*, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca²⁺ influx and mating. *Mol. Cell. Biol.*, 14:8259-8271.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. y Byrns, R. E. (1993): Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:8103-8107.
- Island, M. D., Naider, F. y Becker, J. M. (1987): Regulation of dipeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae* by micromolar amino acid concentrations. *Journal of Bacteriology*, 169:2132-2136.
- Jennings, M. L. y Cui, J. (2008): Chloride homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* : High affinity influx, V-ATPase-dependent sequestration, and identification of a candidate Cl⁻ sensor. *J. Gen. Physiol.*, 131:379-391.
- Jia, W. y Cole, J. A. (2005): Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 33:159-161.
- Jia, W., Tovell, N., Clegg, S., Trimmer, M. y Cole, J. (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. *Biochemical Journal*, 417:297-304.
- Jiang, Y. y Broach, J. R. (1999): Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *The EMBO Journal*, 18:2782-2792.
- Johnstone, I. L., McCabe, P. C., Greaves, P., Gurr, S. J., Cole, G. E., Brow, M. A. D., Unkles, S. E., Clutterbuck, A. J., Kinghorn, J. R. y Innis, M.

- A. (1990): Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 90:181-192.
- Jorgensen, P., Rupeš, I., Sharom, J. R., Schneper, L., Broach, J. R. y Tyers, M. (2004): A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & Development*, 18:2491-2505.
- Kafadar, K. A. y Cyert, M. S. (2004): Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryotic Cell*, 3:1147-1153.
- Karim, S., Holmström, K.-O., Mandal, A., Dahl, P., Hohmann, S., Brader, G., Palva, E. T. y Pirhonen, M. (2007): AtPTR3, a wound-induced peptide transporter needed for defence against virulent bacterial pathogens in *Arabidopsis*. *Planta*, 225:1431
- Kinghorn, J. R., Sloan, J., Kana'n, G. J. M., DaSilva, E. R., Rouch, D. A. y Unkles, S. E. (2005): Missense mutations that inactivate the *Aspergillus nidulans nrtA* gene encoding a high-affinity nitrate transporter. *Genetics*, 169:1369-1377.
- Kingsbury, J. M. y McCusker, J. H. (2010): Homoserine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* homoserine kinase (*thr1Δ*) mutants. *Eukaryotic Cell*, 9:717-728.
- Klasson, H., Fink, G. R. y Ljungdahl, P. O. (1999): Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.*, 19:5405-5416.
- Klepper, L.A. (1987): Nitric Oxide Emissions from Soybean Leaves during in Vivo Nitrate Reductase Assays. *Plant Physiol.*, 85:96-99.

- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. y Nasmyth, K. (1993): A role for the transcription factors Mbpl and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science*, 261:1551-1557.
- Kohn, M. C., Melnick, R. L., Ye, F. y Portier, C. J. (2002): Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 30:676-683.
- Kozak, M. (1981): Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucl. Acids Res.*, 9:5233-5252.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W. R. H., Donaton, M. C. V., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H. y Thevelein, J. M. (1999): A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology*, 32:1002-1012.
- Kronzucker, H. J., Britto, D. T., Davenport, R. J. y Tester, M. (2001): Ammonium toxicity and the real cost of transport. *TRENDS in Plant Science*, 6:1355-1364
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossil, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., Davis, R. W. y Arst, H. N. Jr. (1990): The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal*, 9:1355-1364.
- Kuno, T., Tanaka, H., Mukai, H., Chang, C. D., Hiraga, K., Miyakawa, T. y Tanaka, C. (1991): cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180:1159-1163.

- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157:105-132.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B. y Ward, J. M. (1999): The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *The Plant Cell*, 11:707-726.
- Langdon, T., Sheerins, A., Ravagnani, A., Gielkens, M., Caddik, M. X. y Arst, H. N. (1995): Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus* transcription factor mediating nitrogen metabolite repression. *Molecular Microbiology*, 17:877-888.
- Lauter, F. R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J. W. y Frommer, W. B. (1996): Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:8139-8144.
- Lee, R. B. (1979): The effect of nitrite on root growth of barley and maize. *New Phytologist*, 83:615-622.
- Lee, S. Y. H., Munerol, B., Pollard, S., Youdim, K. A., Pannala, A. S., Kuhnle, G. G. C., Debnam, E. S., Rice-Evans, C. y Spencer, J. P. E. (2006): The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. *Free Radical Biology and Medicine*, 40:323-334.
- Lenburg, M. E. y O'Shea, E. (1996): Signaling phosphate starvation. *Trends in Biochemical Sciences*, 21:383-387.

- Levine, D.W. y Cooney, C. L. (1973): Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Applied Microbiology*, 26:982-990.
- Liebach, F. H. y Ganapathy, V. (1996): Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annual Review of Nutrition*, 16:99-119.
- Lin, C. M., Koh, S., Stacey, G., Yu, S. M., Lin, T. Y. y Tsay, Y. F. (2000): Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice¹. *Plant Physiol.*, 122:379-388.
- Liu, C., Yang, Z., Yang, J., Xia, Z. y Ao, S. (2000): Regulation of the yeast transcriptional factor PHO2 activity by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 275:31972-31978.
- Liu, K. H., Huang, C. Y. y Tsay, Y. F. (1999): CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell*, 11:865-874.
- Liu, K. H. y Tsay, Y. F. (2003): Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22:1005-1013.
- Lledó, B., Marhuenda-Egea, F. C., Martínez-Espinosa, R. M. y Bonete, M. J. (2005): Identification and transcriptional analysis of nitrate assimilation genes in the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Gene*, 361:80-88.
- Locke, E. G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y. y Cunningham, K. W. (2000): A homolog of voltage-gated Ca²⁺ channels stimulated by depletion of secretory Ca²⁺ in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 20:6686-6694.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. y Hall, M. N. (2002): Two TOR

complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell*, 10:457-468.

Lorenz, M. C. y Heitman, J. (1998): The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17:1236-1274.

Lorenz, M. C. y Heitman, J. (1995): TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-Rapamycin. *J. Biol. Chem.*, 270:27531-27537.

Maathius, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D. y Schroeder, J. I. (1997): Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant Physiol.*, 114:1141-1149.

Machín, F., Medina, B., Navarro, F. J., Pérez, M. D., Veenhuis, M., Tejera, P., Lorenzo, H., Lancha, A. y Siverio, J. M. (2004): The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 21:265-276.

Machín, F., Perdomo, G., Pérez, M. D., Brito, N. y Siverio, J. M. (2001): Evidence for multiple nitrate uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiology Letters*, 194:171-174.

MacKown, C. T., Volk, R. J. y Jackson, W. A. (1981): Nitrate accumulation, assimilation, and transport by decapitated corn roots. *Plant Physiol.*, 68:133-138.

Magasanik, B. y Kaiser, C. A. (2002): Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290:1-18.

Makuc, J., Paiva, S., Schauen, M., Krämer, R., André, B., Casal, M., Leão, C. y Boles, E. (2001): The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast*, 18:1131-1143.

- Manson, M. D., Blank, V., Brade, G. y Higgins, C. F. (1986): Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. *Nature*, 321:253-256.
- Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. y Andre, B. (1997): A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 17:4282-4293.
- Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A. J., Fernández, E. y Galván, A. (2006): Differential regulation of the *Chlamydomonas* *Nar1* gene family by carbon and nitrogen. *Protist*, 157:421-433.
- Mariscal, V., Rexach, J., Fernández, E. y Galván, A. (2004): The plastidic nitrite transporter NAR1;1 improves nitrate use efficiency for growth in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell and Environment*, 27:1321-1328.
- Martín, Y., González, Y. V., Cabrera, E., Rodríguez, C. y Siverio, J. M. (2011): Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *J. Biol. Chem.*, 286:27225-27235.
- Martínez Pastor, M., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. y Estruch, F. (1996): The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *The EMBO Journal*, 15:2227-2235.
- Marzluf, G. A. (1981): Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological reviews*, 45:437-461.
- Marzluf, G. A. (1997): Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61:17-32.
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S. y Cunningham, K. W. (1997): Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that

differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 11:3445-3458.

Mathiopoulos, C., Mueller, J. P., Slack, F. J., Murphy, C. G., Patankar, S., Bukusoglu, G. y Sonenshein, L. (1991): A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. *Molecular Microbiology*, 5:1903-1913.

Matsumoto, T. K., Ellsmore, A. J., Cessna, S. G., Low, P. S., Pardo, J. M., Bressan, R. A. y Hasegawa, P. M. (2002): An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277:33075-33080.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. y Foor, F. (1995): Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.*, 15:5671-5681.

McHatton, S., Barry, J. P., Jannasch, H. W. y Nelson, D. C. (1996): High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:954-958.

McKnight, G. M., Duncan, C. W., Leifert, C. y Golden, M. H. (1999): Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, 81:349-358.

Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Serrano, R. y de Larrinoa, I. (2001): Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 265:801-811.

- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R. y de Larrinoa, I. F. (1998): Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Letters*, 425:323-328.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. y Pardo, J. M. (1994): The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 269:8792-8796.
- Merika, M. y Orkin, S. H. (1993): DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, 13:3999-4010.
- Minehart, P. L. y Magasanik, B. (1991): Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.*, 11:6216-6228.
- Moir, J. W. B. y Wood, N. J. (2001): Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58:215-224.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., y Castillo, F. (1999): Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology*, 181:6573-6584.
- Moriya, H. y Johnston, M. (2004): Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:1572-1577.
- Morozov, I. Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M. G. y Caddick, M. X. (2001): Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Molecular Microbiology*, 42:269-277.

- Mortensen, H. D., Jacobsen, T., Koch, A. G. y Ameborg, N. (2008): Intracellular pH homeostasis plays a role in the tolerance of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to acidified nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74:4835-4840.
- Moser, M. J., Geiser, J. R. y Davis, T. N. (1996): Ca²⁺-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 16:4824-4831.
- Muller, E. M., Locke, E. G. y Cunningham, K. W. (2001): Differential regulation of two Ca²⁺ influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159:1527-1538.
- Müller, T., Walter, B., Wirtz, A. y Burkovski, A. (2006): Ammonium toxicity in bacteria. *Current Microbiology*, 52:400-406.
- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T. y Myyakawa, T. (1993): Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J*, 12:4063-4071.
- Navarro, F. J., Machín, F., Martín, Y. y Siverio, J. M. (2006): Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *J. Biol. Chem.*, 281:13268-13274.
- Navarro, F. J., Martín, Y. y Siverio, J. M. (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.
- Navarro, F. J., Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machín, F., Guillén, R. M., Lancha, A. y Siverio, J.M. (2003): The role of nitrate reductase in

- the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, 4:149-155.
- Navarro, M. T., Guerra, E., Fernández, E. y Galván, A. (2000): Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 122:283-289.
- Nölling, J. y Reeve, J. N. (1997): Growth- and substrate-dependent transcription of the formate dehydrogenase (*fdhCAB*) operon in *Methanobacterium thermoformicicum* Z-245. *Journal of Bacteriology*, 179:899-908.
- Okamoto, M., Vidmar, J. J. y Glass, A. D. M. (2003): Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol.*, 44:304-317.
- Omata, T. (1995): Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiol.*, 36:207-213.
- Orsel, M. y Daniel-Vedele, F. (2002): Analysis of the *NRT2* nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol.*, 129:886-896.
- Oshima, Y. (1997): The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Genetic Systems*, 72:323-334.
- Özcan, S., Dover, J. y Johnston, M. (1998): Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19:2566-2573.
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wölfl, S. y Johnston, M. (1996): Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93:12428-12432.

- Paidhungat, M. y Garrett, S. (1997): A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca^{2+} uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol. Cell. Biol.*, 17:6339-6347.
- Panadero, J., Hernández-López, M. J., Prieto, J. A. y Randez-Gil, F. (2007): Overexpression of the calcineurin target *CRZI* provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:4824-4831.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. y Saier, M. H. (1998): Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:1-34.
- Parent, S. A., Nielsen, J. B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A. M., Hsu, M. J., Bostian, K. A. y Foor, F. (1993): Calcineurin-dependent growth of an FK506- and CsA-hypersensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 139:2973-2984.
- Paulsen, I. T. y Skurray, R. A. (1994): The POT family of transport proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 10:404.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B., Goffeau, A. y Saier, M. H. (1998): Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 430:116-125.
- Payne, J. W. y Smith, M. W. (1994): Peptide transport by micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*, 36:1-80.
- Peakman, T., Crouzet, J., Mayaux, J. F., Busby, S., Mohan, S., Harborne, N., Wootton, J., Nicolson, R. y Cole, J. (1990): Nucleotide sequence,

- organisation and structural analysis of the products of genes in the *nirB-cysG* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *European Journal of Biochemistry*, 191:315-323.
- Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallaghet, M. P. y Hoch, J. A. (1991): The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Molecular Microbiology*, 5:173-185.
- Pérez, M. D., González, C., Ávila, J., Brito, N. y Siverio, J. M. (1997): The *YNTI* 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. *Biochemical Journal*, 321:397-403.
- Perry, J. R., Basrai, M. A., Sugiura, M., Naider, F. y Becker, J. M. (1994): Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol. Cell. Biol.*, 14:104-115.
- Persson, B. L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A. y Pattison, J. (1999): Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1422:255-272.
- Peuchen, S., Bolaños, J. P., Heales, S. J. R., Almeida, A., Duchen, M. R. y Clark, J. B. (1997): Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 52:261-281.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.*, 29:2002-2007.
- Pozos, T. C., Sekler, I. y Cyert, M. S. (1996): The product of *HUMI*, a novel yeast gene, is required for vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange and is related

- to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Mol. Cell. Biol.*, 16:3730-3741.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. y Cormier, M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111:229-233.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Borsa, P., Destro, T. y Malagoli, M. (2003): Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. *J. Exp. Bot.*, 54:1023-1031.
- Quesada, A., Galván, A. y Fernández, E. (1994): Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 5:407-419.
- Quesada, A., Hidalgo, J. y Fernández, E. (1998): Three *Nrt2* genes are differentially regulated in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics MGG*, 258:373-377.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M. y Entian, K. D. (1997): Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol. Cell. Biol.*, 17:2502-2510.
- Randez-Gil, F., Sanz, P. y Prieto, J. A. (1999): Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends in Biotechnology*, 17:237-244.
- Regenberg, B., Holmberg, S., Olsen, L. D. y Kielland-Brandt, M. C. (1998): Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetic*, 33:171-177.

- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. y Frommer, W. B. (1995): *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 370:264-268.
- Rexach, J., Fernández, E. y Galván, A. (2000): The *Chlamydomonas reinhardtii* *Nar1* gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *The Plant Cell*, 12:1441-1453.
- Rexach, J., Montero, B., Fernández, E. y Galván, A. (1999): Differential regulation of the high affinity nitrite transport systems III and IV in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, 274:27801-27806.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. y Kaiser, W. M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 53:103-110.
- Rodríguez Galdón, B., Ríos Mesa, D., Rodríguez Rodríguez, E. M. y Díaz Romero, C. (2010): Amino acid content in traditional potato cultivars from the Canary Islands. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 148-153.
- Rodríguez, C., Tejera, P., Medina, B., Guillén, R. M., Domínguez, A., Ramos, J. y Siverio, J. M. (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.
- Rowe, J. J., Ubbink-Kok, T., Molenaar, O., Konings, W. N. y Driessen, J.M. (2009): NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12:579-586.

- Rubio-Teixeira, M., Van Zeebroeck, G., Voordeckers, K. y Thevelein, J. M. (2010): *Saccharomyces cerevisiae* plasmamembrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Research*, 10:134-149.
- Ruiz, A., Serrano, R. y Ariño, J. (2008): Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway. *J. Biol. Chem.*, 283:13923-13933.
- Rusnak, F. y Mertz, P. (2000): Calcineurin: Form and function. *Physiological Reviews*, 80:1483-1521.
- Saier, M. H. Jr. (1994): Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiological reviews*, 58:71-93.
- Salhany, J. M., Yamane, T., Shulman, R. G. y Ogawa, S. (1975): High resolution ³¹P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72:4966-4970.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. y Gaber, R. F. (1992): Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KATI* cDNA. *Science*, 258:1654-1658.
- Schachtman, D. P., Tyerman, S. D. y Terry, B. R. (1991): The K⁺/Na⁺ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. *Plant Physiol.*, 97:598-605.

- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J. y Hall, M. N. (1998): The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *The EMBO Journal*, 17:6924-6931.
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3:1101-1108.
- Segonzac, C., Boyer, J-C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossingnol, M. y Gibrata, R. (2007): Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *The Plant Cell*, 19:3760-3777.
- Serrano, R. (1993): Structure, function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *FEBS Letters*, 325:108-111.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R. y Ariño, J. (2002): The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology*, 46:1319-1333.
- Sivasankar, S., Rothstein, S. y Oaks, A. (1997): Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiol.*, 114:583-589.
- Siverio, J. M. (2002): Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:277-284.
- Snell, F. y Snell, C. (1949): Colorimetric methods of analysis. New York: Van Nostrand.
- Sobol, Z., Cook, N. M. y Schiestl, R. H. (2008): HNO induces DNA deletions in the yeast *S. cerevisiae*. *Mutation Research*, 638:83-89.

- Song, W., Steiner, H-Y., Zhang, L., Naider, F., Stacey, C. y Becker, J. M. (1996): Cloning of a second *Arabidopsis* peptide transport gene. *Plant Physiol.*, 110:171-178.
- Sorger, P. K. y Pelham, H. R. B. (1987): Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *The EMBO Journal*, 6:3035-3041.
- Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., Urrestarazu, A., Jauniaux, J. C. y André, B. (1997): Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 23:1157-1168.
- Spencer, J. P. E., Whiteman, M., Jenner, A. y Halliwell, B. (2000): Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1039-1050.
- Stathopoulos, A. M. y Cyert, M. S. (1997): Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Development*, 11:3432-3444.
- Stathopoulos-Gerontides, A., Guo, J. J. y Cyert, M. S. (1999): Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes & Development*, 13:798-803.
- Steiner, H. Y., Naider, F. y Becker, J. M. (1995): The PTR family: a new group of peptide transporters. *Molecular Microbiology*, 16:825-834.
- Stitt, M. (1999): Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:178-186.
- Stroud, R. M., Miercke, L. J., O'Connell, J., Khademi, S., Lee, J. K., Remis, J., Harries, W., Robles, Y. y Akhavan, D. (2003): Glycerol facilitator

- GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 13:424-431.
- Sugiura, M., Georgescu, M. N. y Takahashi, M. (2007): A Nitrite Transporter Associated with Nitrite Uptake by Higher Plant Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 48:1022-1035.
- Suppmann, B. y Sawers, G. (1994): Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter. *Molecular Microbiology*, 11:965-982.
- Tannenbaum, S. R., Weissman, M. y Fett, D. (1976): The effect of dietary nitrate intake on nitrate formation in human saliva. *Food Cosmetics Toxicol*, 14:549-552.
- Tenovuo, J. (1986): The biochemistry of nitrates, nitrites, nitrosamines and other potential carcinogens in human saliva. *Journal of oral pathology*, 15:303-307.
- ter Schure, E. G., van Riel, N. A. W. y Verrips, T. (2000): The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:67-83.
- Thomas, G. y Hall, M. N. (1997): TOR signalling and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 9:782-787.
- Thukral, S. K., Morrison, M. L. y Young, E. T. (1992): Mutations in the zinc fingers of ADR1 that change the specificity of DNA binding and transactivation. *Mol. Cell. Biol.*, 12:2784-2792.
- Todd, R. B., Fraser, J. A., Wong, K. O., Davis, M. A. y Hynes, M. J. (2005): Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryotic Cell*, 4:1646-1653.

- Trueman, L. J., Richardson, A. y Forde, B. G. (1996): Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 175:223-231.
- Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H. y Hsu, P. K. (2007): Nitrate transporters and peptide transporters. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581:2290-2300.
- Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. y Crawford, N. M. (1993): The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72:705-713.
- Umbreit, W. W., Burris, R. H. y Stauffer, J. F. (1964): Manometric techniques. Minneapolis: Burgess Publishing Co.
- Unkles, S. E., Hawker, K. L., Grieve, C., Campbell, E. I., Montague, P. y Kinghorn, J. R. (1991): *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:204-208.
- Unkles, S. E., Zhou, D., Siddiqi, M. Y., Kinghorn, J. R. y Glass, A. D. M. (2001): Apparent genetic redundancy facilitates ecological plasticity for nitrate transport. *The EMBO Journal*, 20:6246-6255.
- Van Belle, D. y André, B. (2001): A genomic view of yeast membrane transporters. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:389-398.
- Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourenco, A., Quintino, E., Versele, M. y Thevelein, J. M. (2006): Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Molecular Microbiology*, 59:1485-1505.

- Velasco, I., Tenreiro, S., Calderon, I. L. y André, B. (2004): *Saccharomyces cerevisiae* Aqr1 is an internal-membrane transporter involved in excretion of amino acids. *Eukaryotic Cell*, 3:1492-1503.
- Vida, T. A. y Emr, S. D. (1995): A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 128:779-792.
- Vidmar, J. J., Zhuo, D., Siddiqi, M. Y., Schjoerring, J. K., Touraine, B. y Glass, A. D. M. (1999): Regulation of the expression of two new members of the *BCH* family of genes, *BCH3* and *BCH4*, which encode inducible high affinity nitrate transporters in *Hordeum vulgare*, with relation to nitrate influx. In: *Plant nutrition-molecular biology and genetics: Proceedings of the sixth international symposium on genetics and molecular biology of plant nutrition*. 83-94. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A. y Ariño, J. (2004): Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279:43614-43624.
- Vitiello, S. P., Wolfe, D. M. y Pearce, D. A. (2007): Absence of Btn1p in the yeast model for juvenile Batten disease may cause arginine to become toxic to yeast cells. *Human Molecular Genetics*, 16:1007-1016.
- Volland, C., Urban-Grimal, D., Géraud, G. y Haguenaer-Tsapis, R. (1994): Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.*, 269:9833-9841.
- von Wirén, N. y Merrick, M. (2004): Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Topics in Current Genetics*, 9:95-120.

- Wang, R. y Crawford, N. M. (1996): Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:9297-9301.
- Wang, R., Liu, D. y Crawford, N. M. (1998): The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:15134-15139.
- Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y. N., Wang, P., Yan, N. y Shi, Y. (2009): Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462:467-473.
- Wang, Y., Li, W., Siddiqi, Y., Symington, V. F., Kinghorn, J. R., Unkles, S. E. y Glass, A. D. M. (2008): Nitrite transport is mediated by the nitrite-specific high-affinity NitA transporter and by nitrate transporters NrtA, NrtB in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 45:94-102.
- Ward, L. D. y Bussemaker, H. J. (2008): Predicting functional transcription factor binding through alignment-free and affinity-based analysis of orthologous promoter sequences. *Bioinformatics*, 24:i165-i171
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J. M., Barbier-Brygoo, H. y Pugina, A. (2002): Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *The Plant Cell*, 14:1937-1951.
- West, C. E., Waterworth, W. M., Stephens, S. M., Smith, C. P. y Bray, C. M. (1998): Cloning and functional characterisation of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *The Plant Journal*, 15:221-229.

- Williams, L. y Miller, A. (2001): Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:659-688.
- Willis, K. A., Barbara, K. E., Menon, B. B., Moffat, J., Andrews, B. y Santangelo, G. M. (2003): The global transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*, Gcr1p, mediates the response to glucose by stimulating protein synthesis and *CLN*-dependent cell cycle progression. *Genetics*, 165:1017-1029.
- Withee, J. L., Mulholland, J., Jeng, R. y Cyert, M. S. (1997): An essential role of the yeast pheromone-induced Ca²⁺ signal is to activate calcineurin. *Molecular Biology of the Cell*, 8:263-277.
- Wolfe, J. y Bryant, G. (1999): Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39:103-129.
- Wong, K. H., Hynes, M. J. y Davis, M. A. (2008): Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 7:917-925.
- Wu, M. J., O'Doherty, P. J., Fernandez, H. R., Lyons, V., Rogers, P. J., Dawes, I. W. y Higgins, V. J. (2011): An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 11:379-387.
- Wu, Q. y Stewart, V. (1998): NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca (pneumoniae)* M5al. *Journal of Bacteriology*, 180:1311-1322.
- Wullschleger, S., Loewith, R. y Hall, M. N. (2006): TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124:471-484.
- Xia, Z., Turner, G. C., Hwang, C. S., Byrd, C. y Varshavsky, A. (2008): Amino acids induce peptide uptake via accelerated degradation of CUP9,

- the transcriptional repressor of the PTR2 peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, 283:28958-28968.
- Xiao, X., Fu, Y. H. y Marzluf, G. A. (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.
- Xu, Z. y Norris, D. (1998): The *SFP1* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* regulates G2/M transitions during the mitotic cell cycle and DNA-damage response. *Genetics*, 150:1419-1428.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. y Takahashi, S. (1999): An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *TRENDS in Plant Science*, 4:128-129.
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P.O. y Cyert, M.S. (2002): Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277:31079-31088.
- Zaman, Z., Bowman, S. B., Kornfeld, G. D., Brown, A. J. P. y Dawes, I. W. (1999): Transcription factor GCN4 for control of amino acid biosynthesis also regulates the expression of the gene for lipoamide dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 340:855-862.
- Zhou, J. J., Fernández, E., Galván, A. y Miller, A. J. (2000): A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Letters*, 466:225-227.
- Zhou, J. J., Theodoulou, F. L., Muldin, I., Ingemarsson, B. y Miller, A. J. (1998): Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *J. Biol. Chem.*, 273:12017-12023.

Zwingmann, C. y Leibfritz, D. (2005): Ammonia toxicity under hyponatremic conditions in astrocytes: De novo synthesis of amino acids for the osmoregulatory response. *Neurochemistry International*, 47:39-50.



Contents lists available at ScienceDirect

Separation and Purification Technology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/seppur

The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts

Rafaela González-Montelongo, M. Gloria Lobo, Mónica González*

Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2009

Received in revised form

30 December 2009

Accepted 31 December 2009

Keywords:

Musa acuminata Colla AAA by-products

Lipid peroxidation

DPPH• and ABTS•+ free radicals

Solvent extraction

Experimental design

ABSTRACT

A solvent extraction method was developed to obtain methanolic extracts rich in antioxidants from banana peel. Central composite design “2³+star” and response surface methodology were used in order to optimise the number of extraction steps, extraction temperature and extraction time. The number of extractions was statistically the most significant factor in scavenging activity against both DPPH• and ABTS•+ radicals and in the inhibition of TBARS formation, while the extraction temperature had an important impact on the capacity to prevent β-carotene bleaching. However, the effect of the extraction time on antioxidant activity was less important. The optimum values of the factors that influence the capacity to scavenge DPPH• and ABTS•+ radicals or to inhibit β-carotene bleaching were 3 extractions at 25 °C for 0 min in the water bath (the rest of the extraction process included 1 min of high-speed homogenisation and 20 min of centrifugation). Nevertheless, the optimum conditions to obtain extracts that inhibit TBARS formation were 55 °C for 120 min in the water bath with 3 repetitions of the extraction procedure.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipid oxidation is one of the major causes of quality deterioration in lipid-containing foods during industrial processing and storage. This degradation can cause a rancid flavour, alter the colour and destroy liposoluble vitamins and polyunsaturated fatty acids in the food. The food industry tries to minimise this deterioration using different techniques, such as adding synthetic antioxidants like 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene (BHT), tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and propyl gallate (PG). However, use of synthetic antioxidants in food products is strictly regulated due to the potential health hazards caused by such compounds [1]. The growing concern about food safety on the part of consumers, authorities and food industry producers [2] has created a need to identify safer natural alternatives that can be used as food additives.

The food industry has already begun studying fruit by-products as one such alternative because they contain many compounds that have antioxidant activity. For example, grape pomace [3,4], citrus fruits peel [5,6] and by-products from pomegranate [7], starfruit [8] and red and black currant [9] have been evaluated as inexpensive sources of antioxidants.

Direct extraction using solvents is the most common technique employed to obtain extracts with high antioxidant activity [3,5,6].

However, over the last decade new techniques have been introduced that improve the speed and quality of extractions while reducing the amount of organic solvents required. These techniques include ultrasonication-assisted extraction [10], accelerated solvent extraction [11], microwave-assisted extraction [12], supercritical fluid extraction [11] and subcritical water extraction [13]. It has been suggested that enzyme-assisted extraction achieves highly stable extracts with high antioxidant activity and that it is an environmentally friendly method [14,15].

The extraction yield of antioxidant compounds from plant material is influenced mainly by the conditions under which the process of liquid-solid extraction is carried out. Because each plant material has unique properties in terms of structure and composition, when they are combined with solvents the behaviour of the resulting material-solvent system is unpredictable [4]. Our group recently screened different factors that can affect the efficiency of extracting antioxidant compounds from banana peel, concluding that the extracts obtained with methanol have very high antioxidant activity [16]. However, in addition to the solvent, many other factors contribute to the efficiency of the extraction process. For example, high temperatures are reported to improve the efficiency of extraction due to the enhanced diffusion rate and solubility of analytes in solvents; although elevated temperatures can also affect the activity of the extracts due to the degradation of the phytochemical compounds and losses due to volatilisation [17]. In addition, at high temperatures bioactive compounds can react with other components of the plant material, thus impeding extraction. Extraction

* Corresponding author. Tel: +34 922 476310; fax: +34 922 476303.
E-mail address: mgonzal@icia.es (M. González).

of antioxidants is typically conducted at temperatures ranging from 20 to 50 °C [4,5]. Although high extraction times improve extraction efficiency, the degradation rate of antioxidant compounds is time and temperature dependent. Therefore, the combination of high temperatures and high extraction times can contribute to greater losses of these compounds. With this in mind, extraction times between 30 min and 24 h [3,5,6,8] and from 1 to 3 extraction steps [5,6,18] have been used.

In this work studied how variables such as number of extraction steps, temperature and time of contact influence the extraction process of compounds with antioxidant properties from banana peel. Our goal was to establish the optimal conditions for obtaining banana peel extracts with high antioxidant capacity through the use of an experimental design, subjected to mathematical treatment.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Gallic acid, ascorbic acid, Folin-Ciocalteu reagent (2N), linoleic acid, Tween 40, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), hydrogen peroxide (30%), iron(III) chloride, trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), BHT and BHA were purchased from Sigma (Madrid, Spain). (±) 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) and trans-β-carotene were supplied by Aldrich (Madrid, Spain). Phosphatidyl-choline (egg lecithin, refined) was obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The concentration of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) type VI [RZ (A403nm/A275nm) = 2.8], obtained from Sigma, was determined by measuring the absorbance at 403 nm using an extinction coefficient of $\epsilon_{403\text{nm}} = 100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [19]. Methanol and chloroform were purchased from HPLC grade from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). All other reagents used were of analytical grade. Ethrel[®]-48 (48% ethephon) was given by Etisa (Barcelona, Spain).

2.2. Plant material

Banana (*Musa acuminata* Colla AAA, cv. "Grande Naine") was obtained from the research fields of Instituto Canario de Investigaciones Agrarias in Tenerife (Canary Islands, Spain). Banana bunches ($n = 21$) were harvested at physiological maturity stage with similar calibre (33 ± 1 mm, measured in the middle finger of outer whorl of the second hand from the distal end of the bunch). The second hand from the proximal end of each bunch was selected (around 60 kg of banana), dipped in a 1 ml/l solution of Ethrel[®]-48 (48% ethephon, the commercial name of a plant growth regulator which is converted into ethylene when metabolised by a plant) for 1 min to accelerate ripening and stored at 18 °C and 80–90% relative humidity until full-ripeness or stage 6 in the von Loesecke banana colour scale was reached.

The ripeness stage of fruits was characterised, in the middle finger of outer whorl of each banana hand, by peel and pulp colour and firmness, total soluble solids (TSS), pH and titratable acidity. Lightness, hue angle and chromaticity of banana peel, at full-ripeness, were 93 ± 2 , 97 ± 2 and 64 ± 5 , respectively. The colour of banana pulp was also characterised by a lightness of 98 ± 3 , a hue angle of 96 ± 1 and a chromaticity of 42 ± 3 . TSS, pH and titratable acidity were: 24 ± 1 °Brix, 4.7 ± 0.1 and 241 ± 21 mg malic acid/100g, respectively.

After ripening, peels were manually separated (peel:banana ratio, w/w, $39 \pm 4\%$), cut into small pieces ($0.5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$), frozen in liquid nitrogen and freeze-dried at 50 mPa and -40°C (Christ alpha 1–4 LSC freeze-dryer, Osterode, Germany) to decrease the

enzyme activity during storage. The moisture content of peel was found to be $89 \pm 1\%$. The dried banana peel was ground to a fine powder (1.4% > 1 mm; 5.9% between 0.5 and 1 mm; 19.2% between 250 and 500 μm ; 31% between 125 and 250 μm ; 18.7% between 50 and 125 μm ; 23.3% between 20 and 50 μm and 0.5% < 20 μm) by impact grinding with a mill IKA A11 (Staufen im Breisgau, Germany), placed in plastic containers and stored at -20°C until the extractions were carried out.

2.3. Solvent extraction method

An accurately weighed aliquot (0.3g) of freeze-dried peel samples was mixed with 2 ml of methanol. The mixture was homogenised with a Politron PT 6000 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) high-speed blender at $12\,000 \times g$ for 1 min. Next, the sealed tubes were placed in a water bath (time and temperature varied depending on the particular experiment; ranging between 0 and 120 min and between 25 and 55 °C, respectively). All the sealed tubes were covered with foil paper to perform all the operations under reduced light. Extracts were centrifuged at $5000 \times g$ for 20 min in a Jouan CR 312 centrifuge (Thermo Electron Corporation, Madrid, Spain). The extraction time includes the time of the high-speed homogenisation (1 min), the time in the water bath (ranging between 0 and 120 min) and the centrifugation time (20 min). Depending on the experiment, this procedure was repeated between 1 and 3 times; the resulting supernatants were mixed together and a final volume of 6 ml was achieved. The extracts thus obtained were stored at -80°C until their antioxidant potential was assessed through various "in vitro" assays and their extraction yield and bioactive compounds were estimated.

2.4. Experimental design

A central composite design (CCD) "2³+star" projected on a face-centred star design with two centre points was used to identify the relationship between three independent factors and the dependent variables or responses, as well as to determine the optimal conditions for the extraction process. The factors (number of extractions, extraction temperature and extraction time) were set at three separate coded levels (see Section 2.3). The design consisted of 16 randomised runs, doing each extraction process in triplicate ($n = 48$). The antioxidant activity, extraction yield and total polyphenol content were chosen as the dependent variables because of their known dependency on the extraction process. Data from the CCD were approximated to a second-order polynomial equation and analysis of variance (ANOVA) was generated to determine individual linear, quadratic and interaction regression coefficients. The significances of polynomial relations were examined statistically by computing the *F*-value at a probability (*p*) of 0.050. The regression coefficients were then used to make statistical analyses and to generate response surfaces of the regression models. Experiments to determine the adequacy of the model were done by using combinations of variables at different levels (within the experimental range).

2.5. Determining the antioxidant activity of the extracts

The antioxidant properties of the extracts were evaluated by using different methods to obtain information about their activity during different stages of the oxidation reaction. All measurements were made on a Shimadzu UV-vis 160A double-beam spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a Hellma (Jamaica, USA) cell (path length 10^{-2} m). Trolox (a water-soluble analogue of α -tocopherol), ascorbic acid and/or BHA were used as antioxidant activity controls or as standards to calibrate the different employed procedures.

2.5.1. β -Carotene bleaching method

The capacity of the extracts to inhibit lipid peroxidation under accelerated conditions was carried out using a slightly modified version of the method described by Miller [20]. β -Carotene (40 mg) was added to a flask containing linoleic acid (200 mg) and Tween 40 (2 g), all dissolved in 10 ml of chloroform. One millilitre of this solution was then distributed into individual tubes and the chloroform was evaporated to dryness at 40 °C (for 24 h) in a Heto VR-1 evaporator (Allerod, Denmark). Oxygenated deionised water (50 ml), which was generated by bubbling air into water for 60 min, was added to the tubes with vigorous stirring. Methanolic extracts diluted 5 times (7.5 μ l) were thoroughly mixed with 1.5 ml of the aqueous emulsion formed. A control consisting of 7.5 μ l of methanol and 1.5 ml of emulsion was used. To induce autoxidation, the samples were incubated in an incubation block at 50 °C, until the β -carotene had been decolourised (210 min). The antioxidant activity coefficient (AAC) was also estimated as the relative oxidation in the presence and absence of extracts:

$$AAC = \left(\frac{A_t - A_t^0}{A_0^0 - A_0^0} \right) \times 1000$$

where A_t and A_t^0 is extract and control absorbance after incubation for 210 min and A_0^0 is control absorbance measured at zero time. The antioxidant activity was also expressed as g of TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)/100 g dry weight (DW) banana peel. Methanolic solutions of known concentrations of trolox, in the range of 0.1–7.5 mg/l, were used for calibration. A calibration graph [$y(AAC) = 4.7 \times x(\text{mg/l}) + 0.12$, $r^2 0.951$] was constructed by plotting AAC against the antioxidant concentration at seven concentration levels analysed in triplicate. The repeatability of the procedure was always <5%.

2.5.2. DPPH[•] and ABTS^{•+} assays

In order to evaluate the capacity of the extract to trap free radicals, two methods based on the formation of free radicals were employed.

The capacity to scavenge the stable free radical DPPH[•] was monitored according to a slightly modified version of the method used by Brand-Williams et al. [21]. Twenty five microlitres of the extracts, diluted 5 times, or the standards (50–500 mg trolox/l or 50–400 mg ascorbic acid/l) were mixed with 1 ml of methanolic solution containing DPPH[•] radicals (absorbance at 515 nm around 1.000). The mixture was shaken vigorously and left to stand for 15 min until stable absorbance was obtained. The reduction of the DPPH[•] radical was measured at 515 nm. Antioxidant activity (AA, %) was also calculated as scavenging percentage:

$$AA = \frac{A_0^0 - A_t}{A_0^0} \times 100$$

where A_0^0 is control absorbance measured at zero time and A_t is extract absorbance after 15 min. The DPPH[•] concentration was also calculated from calibration curves determined by linear regression: $y(AA, \%) = 0.185 \times x(\text{mg/l}) - 0.003$, $r^2 0.991$ for trolox; and $y(AA, \%) = 0.219 \times x(\text{mg/l}) + 0.005$, $r^2 0.992$ for ascorbic acid. Results were also expressed as g of TEAC or AEAC (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)/100 g DW banana peel.

The scavenging activity was also determined by using a slightly modified version of the method described by Arnao et al. [19]. This method is based on enzymatic generation of the cationic radical of ABTS (ABTS^{•+}) by reacting the ABTS (2 mM in a total volume of 1 ml) with HRP (0.25 μ M in 1 ml) in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5, in the presence of hydrogen peroxide (45 μ M in 1 ml). An aliquot of 50 μ l of the extracts, diluted 5 times, or the standards (25–250 mg/l for trolox or 10–175 mg/l for ascorbic acid) was added to 1 ml of the ABTS^{•+} radical, once it had been gen-

erated (15 min until absorbance reached a steady state) which prevents interference of compounds that can affect radical formation [19]. The assay temperature was controlled at 25 °C using a water bath. The inhibition by the antioxidants was measured at 730 nm at 6 min. The antioxidant activity (AA, %) was calculated as scavenging percentage, with A_t being the absorbance value of the extract at 6 min. The relative capacity of extracts to scavenge the ABTS^{•+} radical was also compared to the antioxidant potency of trolox or ascorbic acid. The results, determined by regression equations [$y(\text{abs}) = 1.157 - 0.0040 \times x(\text{mg/l})$, $r^2 0.976$ for trolox; $y(\text{abs}) = 1.204 - 0.0058 \times x(\text{mg/l})$, $r^2 0.977$ for ascorbic acid] were expressed as g of TEAC or AEAC/100 g DW.

In both methods, a control with the addition of methanol instead of extracts was used. The repeatability of the procedures was always <5%.

2.5.3. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay

A modified TBARS assay [22] was used to measure the capacity of the extracts to react with secondary oxidation products generated in the advanced stages of this reaction. This method is based on the spectrophotometric determination of the malonaldehyde, which is a secondary product formed in the peroxidation of a liposome system induced by ascorbate and iron, when it reacts with TBA. Briefly, phosphatidyl-choline (25 μ l at 50 mg/ml in 1.5:1 (v/v) chloroform:ethanol) and the extracts (50 μ l) were added to 200 μ l of 300 mM potassium chloride containing 1 mM iron chloride. Peroxidation was started by adding ascorbate (125 μ l at 0.16 mM) and incubation at 37 °C for 24 h. The reaction was stopped by adding 0.75 ml of a mixture 1.5:1 (v/v) of 9.4% TCA in 0.47 N hydrochloric acid (pH 1.5) with 1% TBA and 50 μ l of BHT (760 mg/l in ethanol). The mixture was then incubated at 95 °C for 60 min. After cooling and centrifuging at 3000 \times g for 2 min in a Sorvall MC-12 V micro-centrifuge (Dupont Instruments, Connecticut, USA) to remove the precipitated proteins, the colour intensity of TBARS was measured spectrophotometrically at 535 nm. A control without the extract was used to evaluate the phosphatidyl-choline peroxidation. All the values were based on the inhibition ratio (IP, %) calculated as

$$IP = \left(1 - \frac{A_t}{A_c^0} \right) \times 100$$

where A_t and A_c^0 is the absorbance value of the sample and of the fully oxidised control, respectively. The repeatability of the procedure was always <10%.

2.5.4. Effect of the concentration of the extracts on antioxidant activity

The effect of the concentration of the extracts on maximum antioxidant activity was evaluated using dose–response curves. To do this, extracts were concentrated in a vacuum Heto VR-1 evaporator at 40 °C and once again dissolved in methanol until the concentration to be assayed was obtained. EC₅₀ was defined as the extract concentration that provides 50% of maximum antioxidant activity achieved, measured as AAC (β -carotene bleaching), AA (scavenging radicals) or IP (inhibition of TBARS formation), and was calculated from the graph of antioxidant effect versus dried extract concentration (mg extract/ml methanol). All assays were carried out in triplicate.

2.6. Determining extract yield

The total solids extracted or "extract yield" was defined as the amount of dried extract (g) obtained from 100 g of DW banana peel [23]. Their determination was carried out after evaporating to dryness the solvent of the extract in a vacuum Heto VR-1 evaporator at 40 °C.

Table 1
Design matrix in the central composite design and experimental (EV)^a and predicted (PV) values obtained for antioxidant activity in methanolic extracts from banana peel.

Experiment ^b	n _{ex}	T _{ex}	t _{ex} ^c	β-Carotene bleaching				Scavenging DPPH• radicals				Scavenging ABTS•+ radicals				TBARS													
				AAC		TEAC (g/100g)		AA (%)		TEAC (g/100g)		AA (%)		TEAC (g/100g)		IP (%)													
				EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV												
16	1	25	0	201 ± 12	319	0.061 ± 0.002	0.067	36 ± 7	35	1.0 ± 0.3	1.9	47 ± 6	44	2.6 ± 0.4	2.4	23 ± 4	20												
3	1	25	120	288 ± 7	279	0.060 ± 0.002	0.050	41 ± 4	36	2.1 ± 0.2	2.0	40 ± 4	38	2.2 ± 0.4	2.1	14 ± 3	12												
13	1	40	60	283 ± 48	234	0.056 ± 0.007	0.051	37 ± 3	36	2.1 ± 0.1	1.9	39 ± 8	34	2.0 ± 0.1	1.8	15 ± 2	16												
4	1	55	0	315 ± 17	310	0.061 ± 0.001	0.068	33 ± 2	31	1.8 ± 0.1	1.7	54 ± 3	54	2.9 ± 0.3	2.8	20 ± 2	19												
11	1	55	120	490 ± 4	500	0.104 ± 0.001	0.106	36 ± 1	39	2.2 ± 0.3	2.1	56 ± 2	56	3.1 ± 0.1	3.2	1 ± 1	0												
15	2	25	60	370 ± 9	425	0.098 ± 0.005	0.091	40 ± 1	60	2.7 ± 0.1	3.2	66 ± 7	54	3.5 ± 0.8	3.0	24 ± 1	20												
6	2	40	0	436 ± 3	403	0.081 ± 0.010	0.087	45 ± 3	44	2.4 ± 0.2	2.4	68 ± 3	60	3.8 ± 0.1	3.4	31 ± 1	32												
8	2	40	60	370 ± 23	340	0.066 ± 0.003	0.074	52 ± 5	53	3.1 ± 0.1	2.9	52 ± 2	51	3.1 ± 0.1	2.8	33 ± 2	28												
9	2	40	60	376 ± 6	340	0.080 ± 0.001	0.082	53 ± 7	53	2.9 ± 0.4	2.9	53 ± 2	51	3.1 ± 0.3	2.8	30 ± 2	28												
14	2	40	120	415 ± 50	347	0.078 ± 0.006	0.075	43 ± 2	47	2.4 ± 0.1	2.5	66 ± 9	60	3.8 ± 0.4	3.3	32 ± 2	31												
5	2	55	60	478 ± 55	523	0.110 ± 0.011	0.112	59 ± 4	61	3.2 ± 0.2	3.3	66 ± 4	57	3.8 ± 0.2	3.2	19 ± 4	20												
10	3	25	0	507 ± 6	506	0.107 ± 0.001	0.107	55 ± 2	55	3.0 ± 0.1	3.0	85 ± 7	86	5.0 ± 0.7	5.0	15 ± 1	15												
2	3	25	120	380 ± 15	404	0.080 ± 0.004	0.085	52 ± 2	53	2.8 ± 0.1	2.9	81 ± 2	84	4.6 ± 0.2	4.8	25 ± 5	24												
12	3	40	60	208 ± 34	282	0.059 ± 0.004	0.061	54 ± 6	56	3.2 ± 0.2	3.0	79 ± 4	67	4.2 ± 0.3	3.7	31 ± 2	30												
7	3	55	0	463 ± 5	481	0.100 ± 0.009	0.102	47 ± 3	54	2.6 ± 0.1	2.9	77 ± 7	73	4.4 ± 0.4	4.3	26 ± 5	27												
1	3	55	120	432 ± 17	408	0.092 ± 0.004	0.086	59 ± 4	59	3.2 ± 0.2	3.2	72 ± 2	79	4.1 ± 0.1	4.5	32 ± 2	34												
R ²				0.907				0.907				0.848				0.860				0.884		0.900		0.918					
Standard error of the estimate				29				0.007				4				0.2				6				0.3		3			
Durbin–Watson statistic				1.0 (p=0.201)				2.3 (p=0.067)				1.8 (p=0.166)				2.0 (p=0.340)				2.0 (p=0.338)				1.8 (p=0.187)				1.8 (p=0.167)	

n_{ex}, number of extractions; T_{ex}, extraction temperature (°C); t_{ex}, extraction time (min); AAC, antioxidant activity coefficient; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; AA, scavenging percentage; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; IP, inhibition rate. Bold numbers denote the highest values of the extraction method at a 95% confidence level.

^a Values based on freeze-dried banana peel and expressed as the mean ± standard deviation (n=3–9).

^b The numbers (1–16) indicate the randomised order in which the experiments were developed.

^c t_{ex} corresponds to the extraction time in the water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation).

2.7. Determining total phenol content

The total phenol content of the banana peel samples was measured using a modified colorimetric Folin-Ciocalteu procedure [24]. A volume of 200 µl of deionised water and 50 µl of the extract, diluted 5 times, was added to a test tube. Folin-Ciocalteu reagent (50 µl) was added to the solution, shaken and allowed to react for

6 min. Then, 500 µl of 7% sodium carbonate solution was added and the mixture was diluted to 1.3 ml with deionised water. The colour developed for 60 min was read at 765 nm. A calibration curve of gallic acid (ranging from 15 to 250 mg/l) was prepared in methanol, and the results, determined by the regression equation [y (abs) = 0.0032 × x (mg/l) – 0.0001, r² 0.988], were expressed as g of gallic acid equivalents (GAEs)/100 g DW banana peel.

Table 2
Design matrix in the central composite design and experimental (EV)^a and predicted (PV) values obtained for extraction yield, phenolic compounds content and phenolic compounds yield in methanolic extracts from banana peel.

Experiment ^b	n _{ex}	T _{ex}	t _{ex} ^c	Extract yield (g extract/100g)		Total phenolic compounds (gGAE/100g)					
				EV	PV	EV	PV				
16	1	25	0	20 ± 1	18	1.4 ± 0.3	1.3				
3	1	25	120	35 ± 6	36	1.8 ± 0.2	1.8				
13	1	40	60	22 ± 2	20	1.8 ± 0.1	1.8				
4	1	55	0	17 ± 2	16	1.4 ± 0.1	1.4				
11	1	55	120	43 ± 6	46	1.8 ± 0.1	1.9				
15	2	25	60	29 ± 3	32	2.0 ± 0.1	2.3				
6	2	40	0	32 ± 2	36	1.9 ± 0.1	1.9				
8	2	40	60	30 ± 5	33	2.3 ± 0.1	2.3				
9	2	40	60	28 ± 3	33	2.1 ± 0.1	2.3				
14	2	40	120	43 ± 2	43	2.2 ± 0.1	2.2				
5	2	55	60	35 ± 3	38	2.4 ± 0.1	2.4				
10	3	25	0	46 ± 3	50	2.2 ± 0.1	2.2				
2	3	25	120	33 ± 7	34	2.3 ± 0.1	2.3				
12	3	40	60	40 ± 1	37	2.4 ± 0.1	2.4				
7	3	55	0	48 ± 2	52	2.3 ± 0.1	2.3				
1	3	55	120	39 ± 7	47	2.2 ± 0.1	2.3				
R ²				0.859				0.936			
Standard error of the estimate				4				0.1			
Durbin–Watson statistic				2.0 (p=0.309)				2.5 (p=0.077)			

n_{ex}, number of extractions; T_{ex}, extraction temperature (°C); t_{ex}, extraction time (min); GAEs, gallic acid equivalents. Bold numbers denote the highest values of the extraction method at a 95% confidence level.

^a Values based on freeze-dried banana peel and expressed as the mean ± standard deviation (n=3–9).

^b The numbers (1–16) indicate the randomised order in which the experiments were developed.

^c t_{ex} corresponds to the extraction time in the water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation).

2.8. Statistical analysis

Statgraphics Plus version 4.1 (Statistical Graphics, Rockville, USA) was employed to generate design, ANOVA and to obtain the response surface plots. Simple linear correlation analysis was used to measure the correlation between the extract yield or the phenolic compound content and the antioxidant activity of the extracts.

3. Results and discussion

3.1. Diagnostic checking of models on optimisation of the conditions for obtaining high antioxidant banana peel extracts

Three variable factors that can potentially affect extraction of banana peel using methanol to obtain extracts with high antioxidant capacity were selected: number of extraction steps, extraction temperature and extraction time. The minimum and maximum levels (Tables 1 and 2) given to each factor were chosen based on our experience and that of other authors in obtaining extracts with high antioxidant activity from plant by-products [4–6,18].

The design matrix, obtained under the operational conditions employed, includes the results of antioxidant activity measured by using different methods: inhibition of β -carotene co-oxidation in a linoleate model system; scavenging of DPPH[•] and ABTS^{•+} free radicals; and inhibition of phosphatidyl-choline peroxidation (Table 1). It also includes the extract yield and the total phenolic compound content (Table 2). The sequential listing of the experimental design parameters represents the statistically randomised order in which the experiments were undertaken. It should be noted that the modification of the conditions used for the extraction did not affect the extraction of bioactive compounds equally (Tables 1 and 2). The comparison of the experimental values of antioxidant activity with the predicted values revealed that for each antioxidant activity assay the two sets of values were very close, indicating that the experimental models were valid. The coefficients of determination (R^2) indicated that the model (predicted values) explained between 85 and 92% of the variability observed in antioxidant activity (experimental values). The standard error of the estimates had a standard deviation of the residuals between 0.007 (β -carotene bleaching, g TEAC/100 g DW banana peel) and 29 (β -carotene bleaching, AAC) and the Durbin-Watson statistic tests indicated that, since the p value was greater than 0.050 for all the determinations, there was no indication of serial autocorrelation in the residuals, based on the order in which the residuals occur in the data set.

3.2. How extraction variables affect the antioxidant properties of methanolic extracts

3.2.1. Number of extraction steps

ANOVA was used to estimate the statistical significance of the factors and interactions between them that had the greatest effect on obtaining extracts with high antioxidant activity (Table 3). Analysis of the experimental results showed that the number of extraction steps had the greatest impact on scavenging DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals and inhibiting TBARS formation, accounting for 90–93% of the former and 51% of the latter. This factor also had a limited influence on the inhibition of lipid peroxidation in the β -carotene/linoleic acid system (around 7%). To determine the number of extraction steps that led to the greatest antioxidant activity, three-dimensional surface graphs were constructed. Some of the graphs, selected from among those obtained using the experimental model, are shown in Fig. 1. The capacity to inhibit lipid peroxidation and scavenge radicals increased when the num-

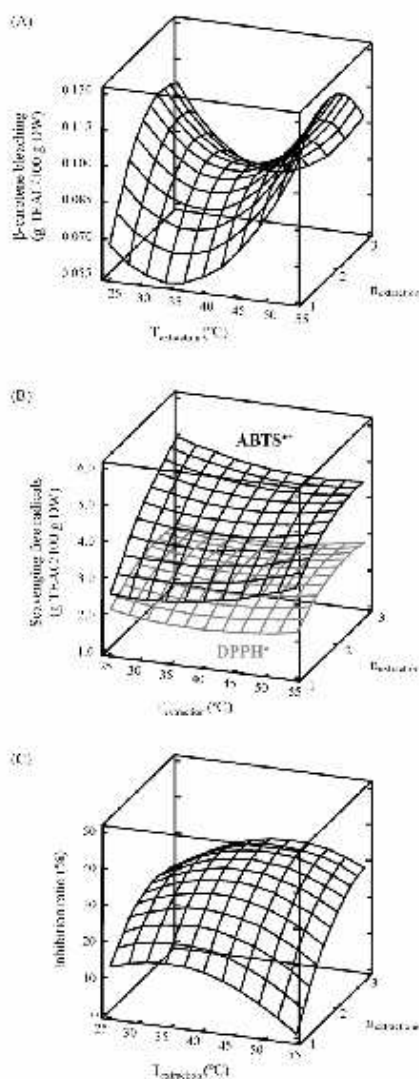


Fig. 1. Estimated response surfaces obtained by plotting the extraction temperature and number of extraction steps for antioxidant activity measured as: inhibition of β -carotene bleaching when fixing extraction time at 0 min (A); scavenging DPPH[•] and ABTS^{•+} free radicals when fixing extraction time at 0 min (B); and inhibiting the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) when fixing extraction time at 120 min (C). TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity. The extraction time indicated corresponds to the time in the water bath; the extraction process also includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation).

Table 3
Estimation of main and interaction effects in the central composite design.

Probability values	Number of extractions (n_{ext})	Extraction temperature (T_{ext} , °C)	Extraction time (t_{ext} , min) ^a	$T_{\text{ext}} \times n_{\text{ext}}$	$t_{\text{ext}}^2 \times n_{\text{ext}}$	$t_{\text{ext}}^2 \times T_{\text{ext}}$
Inhibition of β-carotene bleaching						
AAC	0.001	0.000	0.000	0.000	0.013	0.190
TEAC (g/100 g)	0.001	0.000	0.001	0.000	0.019	0.258
Scavenging radicals						
DPPH [•] , AA (%)	0.000	0.780	0.055	0.321	0.842	0.033
DPPH [•] , TEAC (g/100 g)	0.000	0.235	0.011	0.848	0.000	0.007
ABTS ^{•+} , AA (%)	0.000	0.776	0.136	0.000	0.608	0.410
ABTS ^{•+} , TEAC (g/100 g)	0.000	0.362	0.212	0.000	0.572	0.253
Inhibition of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formation						
IP (%)	0.000	0.156	0.103	0.000	0.000	0.058
Extract yield (g/extract/100 g)	0.000	0.037	0.001	0.291	0.000	0.008
Total phenolics (g GAEs/100 g)	0.000	0.195	0.000	0.531	0.000	0.066

AAC, antioxidant activity coefficient; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; AA, scavenging percentage; IP, inhibition rate; GAEs, gallic acid equivalents. Bold numbers denote significant effects or interactions of the extraction method at a 95% confidence level.

^a t_{ext} corresponds to the extraction time in the water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation).

ber of extraction steps increased. Thus, the optimum number of extractions to obtain extracts with high antioxidant capacity was 3. The number of extractions also affected the extraction of phenolic compounds and total extractable compounds (Table 3), accounting for 80 and 45%, respectively. In general, the process improved by increasing the number of extractions (Fig. 2). The optimal number of extraction steps to obtain these compounds in the extracts was determined to be 3.

The number of extraction steps is not a factor frequently studied for its relationship with the antioxidant activity of extracts. Lesage-Meessen et al. [18] found that the extracts in ethyl acetate from olive by-products obtained with a two-phase centrifugation system had a higher concentration in hydroxytyrosol and a stronger antioxidant activity than those obtained with a traditional three-phase centrifugation system. A single extraction step (3 h) resulted in higher recovery of phenolic compounds from citrus peels than a double extraction (2 × 1.5 h) [5]. Xu et al. [6] suggested that a second extraction with water from citrus peels was necessary since a considerable amount of phenolic compounds (with the consequent increase in antioxidant activity) were extracted from this residue by doing so.

3.2.2. Extraction temperature

Among the factors studied, the extraction temperature had the second greatest impact on how efficiently bioactive compounds, which are responsible for antioxidant activity, were extracted from banana peel (Table 3). This is due to the high impact that this fac-

tor (45–50%) had on the extract's capacity to prevent β -carotene bleaching. The effect of changing the extraction temperature was not statistically significant for scavenging DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals or inhibiting TBARS formation (Table 3 and Fig. 1B). The interaction between extraction temperature and number of extractions was statistically significant for the capacity to protect lipids from oxidation in the β -carotene bleaching assay (accounting for 35%) and in the TBARS test (21%) and for the capacity to scavenge ABTS^{•+} radicals (7%) (Table 3). Therefore, the inhibition of lipid peroxidation in the β -carotene/linoleic acid system increased with number of extraction steps when extraction temperature was 25 °C. However, similar antioxidant activity (in this assay) was obtained at 55 °C for any number of extractions (Fig. 1A). The inhibition of phosphatidyl-choline peroxidation increased when the extraction temperature increased (for 3 extraction steps) (Fig. 1C). This could indicate that it is more difficult to extract the bioactive compounds that inhibit lipid peroxidation in the TBARS assay from the banana peel matrix at low temperatures (possibly because of their lower solubility in methanol) than bioactive compounds that scavenge radicals or inhibit β -carotene bleaching. Thus, the optimum extraction temperature can be fixed at 25 °C to prevent the bleaching of β -carotene and at 55 °C to inhibit TBARS formation (both for 3 extractions). A temperature of 25 °C can be also used as an optimum condition to obtain extracts with high anti-radical activity. Although extraction temperature affected extract yield, its impact on the extraction of extractable compounds was very low (2.5%). This factor did not affect the extraction of total

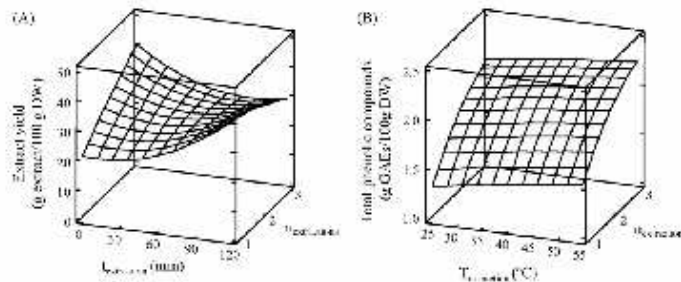


Fig. 2. Estimated response surfaces obtained by plotting the extraction time and number of extractions steps for extract yield when fixing extraction temperature at 25 °C (A) and by plotting the extraction temperature and number of extraction steps for phenolic compounds when fixing extraction time at 0 min (B). GAEs, gallic acid equivalents. The extraction time indicated corresponds to the time in the water bath; the extraction process also includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation).

Table 4
Confirmatory trials of the optimal conditions to obtain methanolic banana peel extracts with high antioxidant activity.

Response parameter	Optimal extraction conditions ^a		Random (non-optimal) extraction conditions ^a	
	3 ext., 25 °C, 0 min experiment 10	3 ext., 55 °C, 120 min experiment 1	1 ext., 25 °C, 120 min experiment 3	1 ext., 55 °C, 0 min experiment 4
Inhibition of β-carotene bleaching				
AAC ^b	500 ± 3	415 ± 9	282 ± 6	313 ± 7
TEAC (g/100 g) ^b	0.107 ± 0.001	0.096 ± 0.002	0.058 ± 0.002	0.055 ± 0.001
EC ₅₀ (mg dried extract/ml)	3.2			
Scavenging radicals				
DPPH [•] , AA (%) ^b	56 ± 1	57 ± 1	39 ± 3	33 ± 4
DPPH [•] , TEAC (g/100 g) ^b	3.1 ± 0.2	3.2 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.2
DPPH [•] , AEAC (g/100 g) ^b	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.0 ± 0.4	1.5 ± 0.1
DPPH [•] , EC ₅₀ (mg dried extract/ml)	3.5			
ABTS ^{•+} , AA (%) ^b	83 ± 5	74 ± 4	36 ± 5	50 ± 3
ABTS ^{•+} , TEAC (g/100 g) ^b	4.9 ± 0.3	4.2 ± 0.2	2.0 ± 0.4	2.5 ± 0.3
ABTS ^{•+} , AEAC (g/100 g) ^b	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.3
ABTS ^{•+} , EC ₅₀ (mg dried extract/ml)	3.0			
Inhibition of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formation				
IP (%) ^b	14 ± 2	34 ± 1	18 ± 1	21 ± 3
EC ₅₀ (mg dried extract/ml)		9.5		
Extract yield (g extract/100 g) ^b	49 ± 4	46 ± 5	38 ± 3	19 ± 4
Total phenolics (g GAE/g 100 g) ^b	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.3

AAC, antioxidant activity coefficient; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; EC₅₀, extract concentration providing 50% antioxidant activity; AA, scavenging percentage; AEAC, ascorbic acid equivalent antioxidant capacity; IP, inhibition rate; GAEs, gallic acid equivalents. Bold numbers denote the optimum conditions for the extraction.

^a The extraction time (0 or 120 min) indicated corresponds to the time in the water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation).

^b Values based on freeze-dried banana peel and expressed as the mean ± standard deviation (n = 3–9).

phenolic compounds from banana peel (Fig. 2B). Therefore, 25 °C can be selected as an adequate temperature to extract phenolic compounds.

Pinelo et al. [4] reported that extraction temperature played a critical role in the efficient extraction of phenolic compounds from grape pomace; the extractions carried out at 50 °C (optimised between 25 and 55 °C) maximised the extract's antiradical activity. The efficiency of the extraction of by-products from star fruit [8] also increased with increased temperature (from 30 to 75 °C). However, to raise the extraction temperature from 40 to 100 °C did not yield a higher content of phenolic compounds and stronger antioxidant capacity in extracts from citrus peel [6]. Li et al. [5] found that antioxidant activity decreased when extraction temperature was increased from 19 to 65 °C and then increased at 80 °C in the extraction of citrus peel with 72% ethanol or with water.

3.2.3. Extraction time

Extraction time significantly affected obtaining extracts that inhibit β -carotene bleaching and scavenge DPPH[•] radicals (Table 3). Nevertheless, the impact of this factor on antioxidant activity was practically negligible (5–8%) in comparison to the number of extraction steps. Zero minutes were the optimum time in the water bath (the rest of the extraction process includes homogenisation and centrifugation time) to obtain antioxidant activity in these stages of oxidation reaction. The interaction between extraction time and number of extractions influenced the inhibition of lipid peroxidation measured as β -carotene bleaching and as TBARS formation (accounting for 3 and 25%, respectively). The influence of this interaction was different in both methods; in general, optimum antioxidant activity was achieved at low extraction times for the β -carotene bleaching test. However, the highest capacity to protect lipids from oxidation in the TBARS test was obtained with high extraction times at 55 °C (the optimum temperature in this case). Although the interaction between extraction time and extraction temperature affected the capacity of extracts to scavenge DPPH[•] radicals, its impact was very low (5%). Extraction time and the interaction between this factor and the number of extraction steps slightly influenced the extraction efficiency of total extractable

compounds (Fig. 2A) and of total phenolic acids (7–10%). The optimal extraction time in the water bath was found to be 0 min when extracting bioactive compounds from banana peels with methanol.

Prolonging the extraction time did not improve antioxidant activity in citrus peel [6] or grape pomace [4] extracts. However a slight increase in the scavenging of ABTS^{•+} radicals with time (from 30 to 60 min) was found in the extraction of star fruit by-products [8]. The antioxidant capacity, measured by using DPPH[•] and β -carotene bleaching tests, of water extracts made of red and black currant by-products did not change by using different extraction times, while grape marc water extracts tended to increase with longer time [9].

3.2.4. The optimal extraction conditions to maximise antioxidant activity of banana extracts

Using 3 extractions, an extraction temperature of 25 °C and an extraction time of 0 min in the water bath (the rest of the extraction process includes homogenisation and centrifugation time) led to the highest antioxidant activity, measured as the capacity to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals and inhibit lipid peroxidation in the β -carotene/linoleic acid system. These conditions also contribute to high extract yield and phenolic compound content in banana peel extracts. However, the optimal conditions to obtain extracts that inhibit TBARS formation were 55 °C for 120 min in the water bath and with 3 repetitions of the extraction procedure. To determine the accuracy of the extraction method, extractions using optimal conditions and random conditions (Table 4) were carried out in triplicate. The experimental values for antioxidant capacity, extract yield and phenolic compound content were quite close to the predicted values which proved that the model was valid. Moreover, the antioxidant activity and the bioactive compounds of the extracts obtained with the optimised method were stable for at least a year when they were stored at –80 °C.

The capacity of the banana peel extracts to inhibit β -carotene bleaching was of 0.107 ± 0.001 g TEAC/100 g DW. An amount of 6.5 mg of dried peel of this fruit (EC₅₀) had an AAC of 325, while BHA (EC₅₀, 250 μ g) or trolox (EC₅₀, 4.2 mg) had an AAC of 375 or 400, respectively. This AAC was similar to that found by Lapornik

et al. [9] with an AAC of 73 for red currant marc or of 400–530 for grape and black currant marc obtained by extracting 500 mg (fresh weight) of by-products with 1 ml of 70% methanol. However, Singh et al. [7] established a significantly higher inhibition of β -carotene bleaching by methanolic DW extracts from pomegranate peel (0.050 mg/ml, 82%) and seed (0.10 mg/ml, 22%).

Extracts had a scavenging capacity against DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals superior to 2.5 ± 0.1 TEAC or AEAC/100 g DW (Table 4). The scavenging activity of extracts from banana peel was concentration dependent; however, the extracts were not as effective as control antioxidants. So, the activity of 7.1 mg dried banana peel (50% scavenging of DPPH[•] radicals) was equivalent to that 400 μ g of BHA or 270 μ g of trolox or ascorbic acid. Moreover, the by-product amount required to scavenge 50% of ABTS^{•+} radicals present in the reaction mixture (6.0 mg dried peel) was higher than those of BHA (86 μ g), trolox (150 μ g) or ascorbic acid (100 μ g). Shui et al. [8] described a similar antioxidant activity, measured by using DPPH[•] and ABTS^{•+} assays, of 3.4 g AEAC/100 g DW or 5.3 g TEAC/100 g DW and a similar content of phenolic compounds in the extracts from star fruit than in those obtained from banana peel. Nevertheless, lower scavenging capacity has been found in methanolic extracts from other fruit by-products such as citrus peel [6] and grape pomace [4].

Extracts were also capable of preventing the formation of TBARS in a dose-dependent manner. On the basis of estimated inhibition rate (Table 4), the most active extract had a capacity of $34 \pm 1\%$ (EC₅₀, 19 mg dried banana peel/ml); however, the activity was lower than that obtained for BHA (EC₅₀, 88 μ g). When the results obtained were compared with those described by other authors, differences were found. So, González-Paramás et al. [22] and Rubilar et al. [25] reported lower EC₅₀ values (between 0.010 and 2.1 mg/ml), and therefore higher inhibition of lipid peroxidation, in by-products of the wine industry.

Using optimised extraction conditions, the by-product yields total extractable compounds of around 50% and had a content of total phenolic compounds of 2.2 ± 0.1 g GAEs/100 g DW, similar to that found by Nguyen et al. [26] in the peel of "Kuai Khai" and "Kuai Hom Thong" banana cultivars.

With all the data obtained for the different extraction conditions evaluated ($n=48$), statistical analysis based on regression lines was carried out to determine if there was any correlation between antioxidant capacity and the extract yield or the phenolic compounds in the extracts. The correlation coefficients indicated a moderately strong relationship between the total extractable compounds and the capacity of the extracts to scavenge ABTS^{•+} radicals ($r > 0.550$, $p = 0.000$). A moderately strong significant correlation ($p = 0.000$) also existed between the phenolic compound content and the antiradical capacity of the extracts ($r > 0.700$ for DPPH[•] and $r > 0.525$ for ABTS^{•+} radicals). The relationship between phenolic compounds and the inhibition of TBARS formation was relatively weak ($r = 0.468$, $p = 0.001$). However, there was not a statistically significant relationship between the capacity of extracts to inhibit β -carotene and the extract yield ($r = 0.270$, $p > 0.065$) or the phenolic compounds composition ($r = 0.075$, $p > 0.610$). The correlations between antioxidant activity and the extract yield or the phenolic compounds illustrate that there are other non-phenolic compounds in the extracts that greatly affect the ability to prevent lipid peroxidation and to scavenge free radicals. Our research group has previously described that bioactive compounds such as ascorbic acid, tocopherols or phytosterols were not detected in methanolic banana peel extracts and that the content of anthocyanins was negligible [16]. Emaga et al. [27] described that banana peel is very rich in total dietary fibre (50% DW). For these reasons, this antioxidant activity could be related to the fibre content in this by-product. In fact, the antioxidant capacity of vegetable fibre has been previously reported [28].

This work demonstrates that extracts rich in antioxidants can be efficiently obtained from banana peel by adequately selecting experimental conditions. Extraction using organic solvents is the most common technique employed to obtain extracts with high antioxidant activity. However, the use of organic solvents in the manufacturing process of food ingredients is strictly regulated. For example, methanol, the extractant used in this work, is not a food-grade solvent; therefore, safer and more environmentally friendly alternative technologies should be developed to obtain extracts rich in antioxidants from banana peel. With this in mind, hydrolysis or enzyme-assisted water extraction of banana peel could be very interesting options. For instance, enzyme-assisted water extraction has some advantages, such as high specificity, mild reactive conditions and maximum preservation of the original efficacy of active compounds, without organic solvent residues.

Moreover, some environmental aspects should be taken into account related to the use of methanol as an extractant. For example, it must be removed from the extracts before they could be used in foods. Moreover, on an industrial scale methanol would have to be recycled using adsorption methods, distillation recovery, membrane systems or catalytic treatment.

Future lines of research could study the use of banana peel extracts, because of their antioxidant activity, in different type of foods. These studies would need to establish the lowest dose of the extract that would have a practical application.

4. Conclusions

Extracts rich in antioxidants can be efficiently obtained from banana peel by adequately selecting experimental conditions. The factor that had the greatest impact on the extract's capacity to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals and inhibit TBARS formation was the number of extraction steps. The extraction temperature had an important effect on the capacity to prevent β -carotene bleaching. Optimum values of the factors that influence the capacity to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals or to inhibit β -carotene bleaching were: 3 extractions, an extraction temperature of 25 °C and an extraction time of 0 min in the water bath (the rest of the extraction process includes homogenisation and centrifugation time). The optimal conditions to obtain extracts that inhibit TBARS formation were 55 °C for 120 min in the water bath and with 3 repetitions of the extraction procedure. The results of this work confirm that optimising solvent extraction is a critical step in obtaining extracts rich in antioxidants from banana by-products. Moreover, this work proves that using experimental design helps to visualise relationships between responses and extraction conditions, while also giving a clear idea of interactions between different extraction conditions.

Acknowledgements

M. González would like to thank the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) for awarding the contract within the framework of the "Recursos y Tecnologías Agrarias del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000–2003" strategic action, financed with the involvement of the European Social Fund. The authors are grateful to the Spain's INIA (Project RTA2006-00187) for financial support.

References

- [1] J. Pokorný, Trends Food Sci. Technol. 2 (1991) 223–227.
- [2] Commission of the European Communities, White Paper on Food Safety COM (1999) 719 Final, Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, 2000.
- [3] T.I. Lafiá, V. Sinanoglou, E.S. Lazos, Food Chem. 104 (2007) 1206–1214.

- [4] M. Pinelo, M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, M.J. Núñez, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2111–2117.
- [5] B.B. Li, B. Smith, M.M. Hossain, *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 182–188.
- [6] G.H. Xu, J.C. Chen, D.H. Liu, Y.H. Zhang, P. Jiang, X.Q. Ye, *J. Food Sci.* 73 (2008) C11–C18.
- [7] R.P. Singh, K.N.C. Murthy, G.K. Jayaprakasha, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 81–86.
- [8] G.H. Shui, L.P. Leong, *Food Chem.* 97 (2006) 277–284.
- [9] B. Lapornik, M. Prosek, A.G. Wondra, *J. Food Eng.* 71 (2005) 214–222.
- [10] M. Ollanketo, A. Peltoketo, K. Hartonen, R. Hinkunen, M.L. Rietkola, *Eur. Food Res. Technol.* 215 (2002) 158–163.
- [11] C.T. da Costa, S.A. Mangolis, B.A. Benner Jr., D. Horton, *J. Chromatogr. A* 831 (1999) 167–178.
- [12] Y.M. Fan, K. Wang, S.Q. Huang, H.S. Wang, X.M. Mu, C.H. He, X.W. Ji, J. Zhang, F.J. Huang, *Food Chem.* 106 (2008) 1264–1270.
- [13] Z.Y. Ju, L.R. Howard, *J. Food Sci.* 70 (2005) S270–S276.
- [14] M. Pinelo, B. Zomora, A.S. Meyer, *Sep. Purif. Technol.* 63 (2008) 620–627.
- [15] B.B. Li, A.B. Smith, M.M. Hossain, *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 180–196.
- [16] R. González-Montelongo, M.C. Lobo, M. González, *Food Chem.* 119 (2010) 1030–1039.
- [17] J.A. Larrauri, P. Rupérez, F. Saura-Calixto, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1300–1303.
- [18] L. Lesage-Meessen, D. Navarro, S. Maunier, J.C. Sigoliot, J. Lorquin, M. Delattre, J.L. Simon, M. Asther, M. Labat, *Food Chem.* 75 (2001) 501–507.
- [19] M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, *Food Chem.* 73 (2001) 230–244.
- [20] H.E. Miller, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48 (1971) 91.
- [21] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *LWT-Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30.
- [22] A.M. González-Paramás, S. Esteban-Ruano, C. Santos-Buelga, S. de Pascual-Teresa, J.C. Rivas-Gonzalo, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 234–238.
- [23] M. Larrosa, R. Llorach, J.C. Espín, F.A. Tomás-Barberán, *LWT-Food Sci. Technol.* 35 (2002) 532–542.
- [24] A. Escarpa, M.C. González, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 119–127.
- [25] M. Rubilar, M. Pinelo, C. Shene, J. Sineiro, M.J. Núñez, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10101–10109.
- [26] T.B.T. Nguyen, S. Ketsa, W.G. van Doorn, *Postharvest. Biol. Technol.* 30 (2003) 187–193.
- [27] T.H. Emaga, R.H. Andrianaivo, B. Wathelet, J.T. Tchango, M. Paquot, *Food Chem.* 103 (2007) 590–600.
- [28] J.A. Larrauri, P. Rupérez, F. Saura-Calixto, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 205 (1997) 39–42.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds

Rafaela González-Montelongo, M. Gloria Lobo, Mónica González*

Post-Harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2009

Received in revised form 16 June 2009

Accepted 5 August 2009

Keywords:

Musa acuminata Colla AAA
 β -Carotene/lipoic acid system
 DPPH radicals
 ABTS⁺ free radicals
 TBARS
 Solvent extraction

ABSTRACT

Banana (*Musa acuminata* Colla AAA) peel extracts obtained in this work had a high capacity to scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS⁺) free radicals, and they were also good lipid peroxidation inhibitors. Acetone:water extracts were considerably more effective (compared with methanol, ethanol, acetone, water, methanol:water or ethanol:water) at inhibiting the peroxidation of lipids in the β -carotene/linoleic acid system or scavenging free radicals. However, aqueous extracts had a high capacity to protect lipids from oxidation in the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test, as well as in the β -carotene bleaching assay. In addition, acetone:water most efficiently extracted all extractable components (54 \pm 4%), phenolic compounds (3.3 \pm 0.8%), and anthocyanin compounds (434 \pm 97 μ g cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g freeze-dried banana peel). Banana peel contained large amounts of dopamine and L-dopa, catecholamines with a significant antioxidant activity. However, ascorbic acid, tocopherols or phytoosterols were not detected in the different extracts. The antioxidant activity of banana peel extracts from different cultivars was similar. However, the impact of extraction time or temperature should be studied in greater depth.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

From an environmental perspective it is vital that plant by-products produced by the agro-food industry be reused. Council Directive 1999/31/EC on landfill waste, requires that member states reduce biodegradable organic waste in landfills by 65% (compared to 1995 levels) by no later than 2016 (European Union, 1998). The main by-product of the banana processing industry is the peel, which represents approximately 30% of the fruit. This by-product constitutes an environmental problem because it contains large quantities of nitrogen and phosphorus and its high water content makes it susceptible to modification by microorganisms.

Potential applications for banana peel depend on its chemical composition. Banana peel is rich in dietary fibre (50% on a dry matter (DW) basis), proteins (7% DW), essential amino acids, polyunsaturated fatty acids and potassium (Emaga, Andrianaivo, Wathélet, Tchango, & Paquot, 2007). Attempts at the practical utilisation of banana by-products include the production of biomass, protein, ethanol, methane, pectins and enzymes (Clarke, Radnidge, Lai, Jensen, & Hardin, 2008; Emaga, Ronkart, Robert, Wathélet, & Paquot, 2008; Essien, Akpan, & Essien, 2005). Banana peel has also been used as food for livestock (Onwuka, Adetiloye, & Afolami, 1997)

or as an adsorbent for water purification (Annadurai, Juang, & Lee, 2002).

Banana peel is rich in phytochemical compounds, mainly antioxidants. The total amount of phenolic compounds in banana (*Musa acuminata* Colla AAA) peel ranges from 0.90 to 3.0 g/100 g DW (Nguyen, Ketsa, & van Doorn, 2003; Someya, Yoshiki, & Okubo, 2002). Someya et al. (2002) identified gallic acid at a concentration of 160 mg/100 g DW. Ripe banana peel also contains other compounds, such as the anthocyanins delphinidin and cyanidin (Seymour, 1993), and catecholamines (Kanazawa & Sakakibara, 2000). Furthermore, carotenoids, such as β -carotene, α -carotene and different xanthophylls, have been identified in banana peel in the range of 300–400 μ g lutein equivalents/100 g (Subagio, Morita, & Sawada, 1996), as well as sterols and triterpenes, such as β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, cycloolecalenol, cycloartenol, and 24-methylene cycloartanol (Knapp & Nicholas, 1969). To date, only Someya et al. (2002) have evaluated the antioxidant activity in banana peel, measured as the effect on lipid autoxidation, in relation to its gallic acid content.

The polarity of the solvent and that of the different antioxidant compounds affects the efficiency of the extraction and the activity of the obtained extracts. Water, methanol, ethanol, acetone, aqueous solutions of the aforementioned solvents and ethyl acetate are commonly used as extraction solvents (Lafka, Sinanoglou, & Lazos, 2007; Pinelo, Rubilar, Jerez, Sineiro, & Núñez, 2005; Shui & Leong, 2006). It must also be kept in mind that certain complications arise

* Corresponding author. Tel.: +34 922 476310; fax: +34 922 476303.
 E-mail address: mgonzalez@icia.es (M. González).

when recovering phytochemical compounds from plant by-products due to their high enzyme activity. However, drying the plant by-product before extraction, immediately immersing the by-product in methanol (Arts & Hollman, 1998) and using an acid extraction medium protects the material from oxidation. The pH of the water can determine the degree of solubility of water-soluble compounds and also influence the possible solubilisation of the hydrolysable fraction (Lafka et al., 2007). Other factors, such as extraction temperature and time (Lafka et al., 2007; Pinelo et al., 2005; Shui & Leong, 2006), the liquid-to-solid ratio and the cultivar (González-Paramás, Esteban-Ruano, Santos-Buelga, de Pascual-Teresa, & Rivas-Gonzalo, 2004), also affect extraction with solvents.

Comparative studies must be carried out for each plant by-product to identify the extraction conditions that produce maximum antioxidant activity. This work is a first attempt at identifying those conditions for banana peels. To this end, various factors that could affect extraction efficiency were tested: the use of solvents with different polarities (methanol, ethanol, acetone, water and mixtures (1:1, v:v) of the organic solvents and water), the pH of the water when it is used as an extractant (3.0–8.0), the extraction time (1 or 120 min), the extraction temperature (25 or 55 °C) and the banana cultivar ("Grande Naine" and "Gruasa"). In addition, the bioactive compounds (phenolic compounds, anthocyanins, catecholamines, ascorbic acid, tocopherols and phytoosterols) that may be responsible for antioxidant activity were characterised. This information is useful to help characterise the extracts obtained from banana peel.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Dopamine, L-dopa (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), ascorbic acid, gallic acid, α -tocopherol, δ -tocopherol, γ -tocopherol, β -sitosterol, stigmasterol and campesterol were purchased from Sigma (Madrid, Spain). (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and β -tocopherol were supplied by Aldrich (Madrid, Spain) and Supelco (Madrid, Spain), respectively. Methanol, ethanol, acetone, *n*-hexane and chloroform were purchased from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain) and 1-pentanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), all HPLC grade. Deionised water of 18 M Ω cm resistivity, purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA), was used. *trans*- β -Carotene and phosphatidyl-choline (refined egg lecithin) were obtained from Aldrich and from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), respectively. Linoleic acid, Tween 40, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), hydrogen peroxide (30%), iron(III) chloride, trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), butylated hydroxytoluene (BHT) and Folin-Ciocalteu reagent (2 N) were supplied by Sigma. The concentration of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) Type VI [RZ ($A_{403\text{ nm}}/A_{275\text{ nm}}$) = 2.8], obtained from Sigma, was determined by measuring the absorbance at 403 nm using an extinction coefficient of $\epsilon_{403\text{ nm}} = 100\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Arnao, Cano, & Acosta, 2001). N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS) and anhydrous pyridine were purchased from Fluka (Madrid, Spain). All other reagents used were of analytical grade. Ethrel $^{\circledR}$ -48 (48% ethephon) was provided by Etisa (Barcelona, Spain).

2.2. Plant material

Two cultivars of banana (*Musa acuminata* Colla AAA), "Grande Naine" and "Gruasa" (Canary Islands Dwarf Cavendish selection), were obtained from the research fields of Instituto Canario de

Investigaciones Agrarias in Tenerife (Canary Islands, Spain). Both cultivars were grown under the same agricultural practices and crop conditions. Banana bunches ($n = 21$) were harvested at physiological maturity stage with a similar calibre (33 ± 1 mm, measured in the middle finger of the outer whorl of the second hand from the distal end of the bunch). The second hand from the proximal end of each bunch (approximately 60 kg of banana per cultivar) was selected, dipped in a 1 ml/l solution of Ethrel $^{\circledR}$ -48 for 1 min to accelerate ripening and stored at 18 °C and 80–90% relative humidity until full-ripeness or stage 6 in the von Loesbeck banana colour scale was reached.

The ripeness stage of the bananas was characterised in the middle finger of the outer whorl of each banana hand. When fully ripe, both cultivars possessed similar peel and pulp colour, firmness, total soluble solids content (TSS) and pH. Banana peel lightness, hue angle and chromaticity were 81 ± 7 , 97 ± 2 and 65 ± 5 , respectively. The colour of the banana pulp was characterised by a lightness of 84 ± 9 , a hue angle of 96 ± 2 and a chromaticity of 42 ± 4 . Fruit and pulp firmness were 20 ± 2 N and 0.87 ± 0.14 N/g respectively. TSS (24 ± 1 Brix) and pH (4.6 ± 0.1) were similar for both cultivars; however, acid content was higher for "Gruasa" cultivar (317 ± 43 mg malic acid/100 g) than for "Grande Naine" cultivar (241 ± 21 mg malic acid/100 g).

Once the bananas were ripe, peels were manually separated (peel:banana ratio, $38 \pm 4\%$), cut into small pieces, frozen in liquid nitrogen and freeze-dried at 50 mPa and -40 °C (Christ alpha-1-4 LSC, Osterode, Germany) to decrease the enzyme activity during storage. The moisture content of peel was found to be $88 \pm 2\%$. The dried banana peel was ground to a fine powder, placed in plastic containers and stored at -20 °C until the extractions were carried out.

2.3. Solvent extraction

The freeze-dried banana peel (0.15 g) was extracted with 3 ml of different solvents: methanol, ethanol, acetone, water acidified with hydrochloric acid (pH 3.0) or mixtures (1:1, v:v) of the organic solvents and water. In order to determine the effect of the pH of the aqueous medium on the antioxidant activity of the extracts, the pH of the water was adjusted to between 3.0 and 8.0 with hydrochloric acid or sodium hydroxide. The mixture was homogenised with a Politron PT-6000 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) high speed blender at 12,000g for 1 min. The extractions were carried out in sealed tubes in a water bath for 1 or 120 min (extraction temperature of 25 or 55 °C). Precautions were taken in order to perform all the operations under reduced light and at 4 °C. Extracts were centrifuged at 5000g for 20 min in a Jouan CR-312 centrifuge (Thermo Electron Corporation, Madrid, Spain). The extracts obtained were stored at -80 °C for less than three days, at which time the antioxidant potential, extraction yield and bioactive compounds were estimated. Each extraction process was done at least in triplicate (3–9 times).

2.4. Extract antioxidant activity

All measurements to determine antioxidant activity were made on a Shimadzu UV-visible 160A double-beam spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a Hellma (Jamaica, NY) cell (path-length 10^{-2} m). Trolox (a water-soluble analogue of α -tocopherol) and/or ascorbic acid were used as standards to calibrate the methods. The type and polarity of the solvent used to extract antioxidants from banana peel can affect single electron transfer and hydrogen atom transfer, which are key aspects in the measurements of antioxidant capacity (Becker, Nissen, & Skibsted, 2004). For this reason, the calibration of each method was carried out in

each of the evaluated solvents (methanol, ethanol, acetone water or mixtures (1:1, v:v) of the organic solvents and water).

2.4.1. Extract capacity to inhibit lipid peroxidation: β -carotene bleaching assay

The β -carotene bleaching method is based on the capacity of antioxidants to decrease oxidative losses of β -carotene in a β -carotene/linoleic acid system. Forty milligrams of β -carotene, 200 mg of linoleic acid and 2 g of Tween 40 were dissolved in 10 ml of chloroform. One millilitre of this solution was then distributed into individual tubes and the organic solvent was removed at 40 °C (for 24 h) in a Heto VR-1 evaporator (Allerod, Denmark). Oxygenated water (50 ml) generated by bubbling air into deionised water for 60 min was added to the tubes with vigorous stirring. Aliquots (1.5 ml) of the aqueous emulsion formed were then added to tubes containing 75 μ l of the extracts, diluted by a factor of 5, and mixed thoroughly. A control sample with the different solvents used in the extractions instead of extract was analysed for antioxidant activity. To induce autooxidation, the tubes were placed in an incubation block at 50 °C, until the β -carotene was decolourised (210 min).

The antioxidant activity was expressed as mg of Trolox equivalents (TE)/100 g DW banana peel. Solutions in the four assayed solvents of Trolox in the 0.1–7.5 mg/l range were used for calibration ($r^2 = 0.927$ – 0.989). The repeatability standard deviation of the procedure was always <5%. Antioxidant activity coefficient (AAC) was also estimated as the relative oxidation in the presence and absence of extracts:

$$AAC = \left(\frac{A_t - A_t^0}{A_0^0 - A_t^0} \right) \times 1000$$

where A_t and A_t^0 are extract and control absorbance after incubation for 210 min and A_0^0 is control absorbance measured at zero time.

2.4.2. Extract capacity to scavenge radicals

With the objective of evaluating the capacity of the extracts to scavenge free radicals, two methods were used, based on the formation of stable free radicals like 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}).

One millilitre of a methanolic solution of DPPH (with an absorbance of approximately 1.000) was added to 25 μ l of the different extracts, diluted by a factor of 5. The decrease in absorbance was recorded at 515 nm after 15 min (when absorbance reached a steady state).

Scavenging activity was also determined with a slightly modified version of the method described by Arnao et al. (2001). This method is based on enzymatic generation with 0.25 μ M of the enzyme horseradish peroxidase HRP (in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5) of the cationic radical ABTS^{•+} (2 mM ABTS) in the presence of hydrogen peroxide (45 μ M), in a total volume of 1 ml. The antioxidant extracts (50 μ l) were diluted by a factor of 5 and then added to 1 ml of the ABTS^{•+} radical once it was formed (15 min until stable absorbance), thereby preventing interference from compounds that can affect radical formation. The assay temperature was controlled at 25 °C using a water bath and the antioxidant inhibition was measured at 730 nm after 6 min.

In both methods, a control with the addition of the different solvents assayed (instead of extracts) was used. Results were expressed as g of TE or AE (ascorbic acid equivalents)/100 g DW banana peel. Calibration graphs for each of the solvents evaluated ($r^2 = 0.940$ – 0.997) were constructed by plotting the absorbance against the antioxidant concentration at seven concentration levels analysed in triplicate (50–500 mg Trolox/l and 25–250 mg ascorbic acid/l). The repeatability standard deviation of the procedure was

<5%. The antioxidant activity (AA, %) was also calculated as scavenging percentage:

$$AA = \frac{A_0^0 - A_t}{A_0^0} \times 100$$

where A_0^0 is control absorbance measured at zero time and A_t is extract absorbance at the time when antioxidant activity is evaluated (15 min for DPPH method and 6 min for ABTS^{•+} method).

2.4.3. Extract capacity to inhibit lipid peroxidation: TBARS assay

The capacity of the extracts to inhibit lipid peroxidation was also evaluated by using the modified assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (González-Paramás et al., 2004). The method is based on the peroxidation of a liposome system (25 μ l of 50 mg/ml phosphatidyl-choline in 1.5:1 (v:v) chloroform:ethanol) induced by 200 μ l of 1 mM iron chloride containing 300 mM potassium chloride in the presence of the extracts (50 μ l). Peroxidation was started by adding ascorbate (125 μ l at 0.16 mM) and incubating at 37 °C for 24 h. The reaction was stopped by adding 0.75 ml of a mixture 1.5:1 (v:v) of 9.4% TCA in 0.47 N hydrochloric acid (pH 1.5) with 1% TBA and 50 μ l of BHT (760 mg/l in ethanol). The production of TBARS, mainly malonaldehyde, as a secondary product of peroxidation, was measured spectrophotometrically at 535 nm after incubation at 95 °C for 60 min.

A control without the extracts (with the different solvents used in the extractions) was used to evaluate the phosphatidyl-choline peroxidation as inhibition ratio (IP, %):

$$IP = \left(1 - \frac{A_t}{A_t^0} \right) \times 100$$

where A_t and A_t^0 are extract and control absorbance after incubation for 60 min. The repeatability standard deviation of the procedure was always <10%.

2.5. Extract yield determination

The different extracts obtained were evaporated to dryness in a Heto VR-1 vacuum evaporator at 40 °C. The extract yield was defined as the amount of dried extract (g) obtained from 100 g of banana peel DW (Llorach, Espín, Tomás-Barberán, & Ferreres, 2002).

2.6. Bioactive compound determination

2.6.1. Total extractable phenols

Phenolic compound content was estimated by mixing 200 μ l of deionised water, 50 μ l of the extracts diluted by a factor of 5 and 50 μ l of Folin-Ciocalteu reagent. After 6 min, 500 μ l of 7% sodium carbonate solution were added to the mixture, which was adjusted to 1.3 ml with deionised water and allowed to stand at room temperature for 60 min. Then, the absorbance was read at 765 nm. Gallic acid (ranging from 15 to 250 mg/l) was used to construct the calibration curves ($r^2 = 0.904$ – 0.998), in the different solvents evaluated. The results were expressed as g of gallic acid equivalents (GAE)/100 g banana peel DW.

2.6.2. Monomeric anthocyanins

The total monomeric anthocyanin content of the banana peels was measured using a spectrophotometric pH differential protocol (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005). To increase the detection limit the banana peel extracts were obtained from 300 mg of dried banana peel extracted with 2 ml of the different solvents. The extracts were mixed thoroughly with 0.025 M potassium chloride pH 1.0 buffer in 1:36 ratio of extract to buffer and the absorbance of the mixture was measured at 510 and 700 nm after 15 min. The

extracts were combined similarly with 0.4 M sodium acetate buffer pH 4.5 and the absorbance of these solutions was measured at the same wavelengths. The anthocyanin concentration in the extracts was calculated as follows:

monomeric anthocyanins (mg/l)

$$= \frac{(A_{515} - A_{700})_{\text{pH} 1.0} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH} 4.5}}{\epsilon \times l} \times MW \times \left(\frac{1000}{8 \times l} \right)$$

where A is absorbance, MW is molecular weight for cyanidin 3-glucoside (449.2 g/mol), ϵ is the molar extinction coefficient of cyanidin 3-glucoside (26,900 l/mol cm⁻¹) and l is path-length (cm), and expressed as mg of cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g banana peel DW.

2.6.3. Catecholamines

All liquid chromatographic analyses were carried out on a Shimadzu (Kyoto, Japan) modular chromatographic system, equipped with a LC-10AD pump, a RF-10 spectrofluorometric (catecholamines) or a SPD-10AV UV-visible (ascorbic acid and tocopherols) detector and controlled via Shimadzu LC-Solution software. The injection valve was a Rheodyne 7725i (Cotati, CA) with an injection loop of 20 μ l.

Catecholamines (dopamine and L-dopa) were analysed using an isocratic liquid chromatographic (LC) method with fluorescence detection (Zydrón, Baranowski, Bialkowski, & Baranowska, 2005). The analytical column was a Spherisorb ODS-2 RP-C₁₈ (Alltech, Deerfield, IL), 5 μ m particle size, 250 \times 4.6 mm i.d. A 0.1 M acetate buffer (pH 4.66) and methanol (97:3%, v:v) was used as mobile phase at a flow rate of 0.8 ml/min. The excitation and emission detection wavelengths were set at 285 and 315 nm, respectively.

The catecholamines were identified by comparing their fluorescence spectral characteristics and retention time with those of commercial standards. The spectra (from 250 to 350 nm) were recorded for the peaks that could be identified as dopamine or L-dopa by retention time.

2.6.4. Ascorbic acid

Ascorbic acid in the extracts was determined (Gökmen, Kahrman, Demir, & Acar, 2000) using LC with UV-visible detection on a Spherisorb ODS-2 RP-C₁₈ (Alltech) column (5 μ m particle size, 250 \times 4.6 mm i.d.). A 0.2 M potassium phosphate monobasic solution in Milli-Q water was used as mobile phase (pH adjusted to 2.4 with orthophosphoric acid) at a flow rate of 0.5 ml/min. Detection wavelength for the detector was set at 254 nm.

2.6.5. Tocopherols

Tocopherol separation (α -, β -, δ - and γ -tocopherols) was done by normal-phase LC using a 5 μ m particle size Kromasil 60-Silica (Scharlab, Barcelona, Spain) column (250 \times 4.6 mm i.d.) with an isocratic *n*-hexane:1-pentanol (98.5:1.5, v:v) mobile phase at a flow rate of 1.5 ml/min (Pyka & Sliwiak, 2001). Analytes were detected at 290 nm. In the case of extracts in methanol and water (solvents incompatible with the mobile phase), the solvent was evaporated to dryness in a Heto VR-1 vacuum evaporator at 25 °C and the residue reconstituted in ethanol.

The ascorbic acid and tocopherols were identified by comparing their UV-visible spectral characteristics and retention times with those of commercial standards. The spectra (from 190 to 400 nm) were recorded for the peaks that could be identified as ascorbic acid or a particular tocopherol by retention time, using a Shimadzu SPD-M6A UV-visible diode array detector.

2.6.6. Phytosterols

Phytosterols (β -sitosterol, stigmasterol y campesterol) were analysed using gas chromatography-mass spectrometry as their

trimethylsilyl ether derivatives (Abidi, 2001). An aliquot (500 μ l) of the extracts in the different solvents evaluated was evaporated to dryness in a Heto VR-1 vacuum evaporator at 25 °C. Then, 100 μ l of anhydrous pyridine and 100 μ l of the derivatisation reagent containing 99% BSTFA and 1% TMCS were added. The sample was incubated at 60 °C for 30 min and allowed to stand overnight at room temperature.

Analyses were carried out on a Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a TRB-5 fused-silica capillary column, 30 m \times 0.25 mm i.d. (coated with a 0.25 μ m thick film of 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane) from Supelco. The chromatographic conditions were: an initial temperature 250 °C (1 min), followed by a gradient of 0.5 °C/min to 270 °C, which was held for 1 min. The injector temperature was 300 °C. Helium (6.0 grade; Air Liquide, Tenerife, Spain) was used as the carrier gas, at a flow rate of 1 ml/min.

The identities of eluted GC peaks were confirmed by comparing their mass spectra (from m/z 50 to 500 in the electron impact mode) and retention times with those of the sterol standards. To achieve this, the chromatograph was coupled to a Shimadzu QP-5000 mass spectrometer. The transfer line and source temperature were 250 and 220 °C, respectively; the ionisation energy was 70 eV. Samples (1 μ l) were injected in the split mode (1:10 ratio).

2.7. Statistical analysis

Data analysis was carried out with Statgraphics-Plus software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD). Grubbs' test was applied to detect outliers in the data set and analysis of variance was used to evaluate the effect of the solvent, pH of the water used as extractant, extraction temperature, extraction time and banana cultivar on antioxidant activity, extraction yield and bioactive compound content in banana peel extracts. Fisher's least significant difference test, at the 5% significance level, was applied to experimental results to assess intra-pair differences.

3. Results and discussion

3.1. Extract antioxidant activity

Four different methods were used to determine the antioxidant properties of the banana peel extracts, to obtain information about the activity of those extracts in the different stages of the oxidation reaction. The methods were inhibition of β -carotene co-oxidation in a linoleate model system, scavenging of DPPH[•] and ABTS^{•+} free radicals and inhibition of peroxidation of phosphatidyl-choline which is induced by the ascorbate/iron complex.

All the extracts assayed prevented the bleaching of β -carotene in carotene/linoleic acid mixtures (Table 1). However, banana peel extracts prepared by different solvents exhibited varying degrees of antioxidant capacity. When extraction was done for 1 min, the extracts obtained with acetone:water were the most effective in inhibiting the oxidation of linoleic acid and subsequent bleaching of β -carotene, in comparison with the control. The extracts obtained with methanol:water, ethanol:water, methanol, ethanol or water had lower antioxidant activity in the β -carotene/linoleic acid system, 40–75% of the inhibition of extracts obtained with acetone:water. The extracts obtained with acetone were the least effective in minimising the oxidation of lipids (around 20% of the efficiency of extracts obtained with acetone:water). The antioxidant activity coefficient remained constant in extracts where water pH ranged from 4.0 to 7.0 (269 \pm 24), being slightly higher than when extraction was done with water at pH 3.0 (220 \pm 10). However, antioxidant capacity decreased drastically when water pH was adjusted to 8.0. Only the antioxidant activity of extracts in

Table 1
Antioxidant activity of banana peel extracts in a β -carotene/linoleate model system.

Extraction solvent	"Grande Naine"				"Gruesa"			
	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min
Antioxidant capacity (mg Trolox equivalents/100 g DW)								
Methanol	61 ± 2 ^{ab}	40 ± 1 ^c	60 ± 1 ^{ab}	104 ± 1 ^{ba}	91 ± 1 ^{ab}	60 ± 4 ^{ab}	100 ± 17 ^{ba}	111 ± 6 ^{ba}
Ethanol	40 ± 4 ^{ab}	54 ± 1 ^{ab}	50 ± 3 ^{ab}	75 ± 5 ^{ba}	87 ± 5 ^{ba}	54 ± 1 ^{ab}	63 ± 4 ^{bc}	80 ± 3 ^{ab}
Acetone	21 ± 1 ^c	41 ± 8 ^{ab}	21 ± 1 ^c	75 ± 4 ^{ba}	25 ± 3 ^{bc}	48 ± 3 ^{ab}	25 ± 3 ^{bc}	91 ± 16 ^{ba}
Water	53 ± 2 ^a	48 ± 1 ^c	54 ± 1 ^d	52 ± 8 ^a	87 ± 1 ^{ab}	46 ± 1 ^{ab}	88 ± 3 ^{ba}	48 ± 1 ^{ab}
Methanol:water (1:1)	87 ± 4 ^b	85 ± 9 ^b	91 ± 8 ^b	94 ± 5 ^c	88 ± 1 ^{ab}	87 ± 5 ^{ba}	92 ± 2 ^{ab}	98 ± 2 ^{ba}
Ethanol:water (1:1)	79 ± 3 ^c	79 ± 9 ^b	86 ± 1 ^b	90 ± 5 ^c	82 ± 7 ^{ab}	77 ± 3 ^{ab}	95 ± 2 ^{ba}	90 ± 3 ^{ba}
Acetone:water (1:1)	116 ± 1 ^a	128 ± 15 ^a	133 ± 3 ^a	116 ± 4 ^a	132 ± 9 ^{ab}	108 ± 5 ^{bc}	128 ± 2 ^{ab}	145 ± 5 ^{ba}
Antioxidant activity coefficient, AAC								
Methanol	287 ± 8 ^{ab}	188 ± 7 ^c	283 ± 8 ^{ab}	490 ± 4 ^{ba}	428 ± 84 ^{ba}	242 ± 18 ^{ab}	518 ± 79 ^{ba}	522 ± 29 ^{ba}
Ethanol	230 ± 19 ^{abc}	216 ± 3 ^c	254 ± 13 ^{ab}	350 ± 24 ^{ba}	408 ± 21 ^{ba}	216 ± 3 ^{ab}	295 ± 17 ^{bc}	377 ± 12 ^{ab}
Acetone	85 ± 5 ^c	166 ± 31 ^{ab}	85 ± 5 ^c	299 ± 18 ^{ab}	99 ± 13 ^c	192 ± 14 ^{ab}	99 ± 13 ^c	368 ± 66 ^{ba}
Water	216 ± 10 ^a	197 ± 3 ^b	220 ± 3 ^a	214 ± 31 ^f	358 ± 73 ^{ba}	188 ± 9 ^{ab}	345 ± 11 ^{ab}	203 ± 9 ^{ab}
Methanol:water (1:1)	412 ± 24 ^b	404 ± 44 ^b	434 ± 39 ^b	461 ± 19 ^{bc}	416 ± 6 ^{ab}	413 ± 23 ^{ba}	432 ± 11 ^{ab}	465 ± 8 ^{ba}
Ethanol:water (1:1)	389 ± 5 ^b	381 ± 46 ^b	410 ± 2 ^b	432 ± 28 ^c	385 ± 26 ^{bc}	366 ± 9 ^c	456 ± 3 ^{ba}	428 ± 5 ^{ab}
Acetone:water (1:1)	560 ± 25 ^a	607 ± 79 ^a	628 ± 17 ^a	574 ± 17 ^a	627 ± 29 ^{ab}	517 ± 14 ^{bc}	606 ± 4 ^{ab}	681 ± 27 ^{ba}

Values are the mean ± standard deviation of at least three determinations (n = 3–9).

Within a column (a–f) or a row (A–D), different letters denote significant differences (p < 0.050) between extraction solvent or extraction conditions (temperature and time), respectively.

acetone showed a clear tendency to increase when extraction time and extraction temperature increased. So, the inhibition of the linoleic acid oxidation was 2–3.5 times higher when extraction was done for 120 min than for 1 min. Similarly, increasing the extraction temperature from 25 to 55 °C (for 120 min) nearly doubled antioxidant activity. However, increasing extraction temperature or time when using other solvents did not have a clear or significant effect on the antioxidant activity in the β -carotene/linoleic acid system. The antioxidant activity described for banana peel extracts in this work was similar to that reported by Lopez et al. (2008) and Wondol et al. (2005) for red currant and grape marc and slightly lower than for blackcurrant by-products. While extraction time did not affect the antioxidant activity of currant by-product extracts, in the case of grape marc extracts, the inhibition of linoleic acid oxidation increased with the time of extraction.

Banana peel extracts showed strong scavenging activity against both DPPH[•] (Table 2) and ABTS^{•+} (Table 3) radicals. Extracts obtained with acetone:water had the highest antioxidant activity compared with the other solvents assayed by a factor ranging between 1.3–1.9 (methanol) and 2.5–3.5 (acetone) for the DPPH[•] assay and a factor ranging between 2–4 (methanol) and around 10–35 (acetone and water in "Grande Naine", and ethanol, acetone and water in "Gruesa") for the ABTS^{•+} assay. The radical-scavenging activity of the extracts obtained with acetone:water was superior to 1.8 g TE or AE/100 g of freeze-dried residue powder. Although ethanolic extracts showed higher DPPH[•] inhibition percentages than extracts obtained with acetone (4.5–5.5-fold greater), the activities against ABTS^{•+} radicals of the extracts obtained with these solvents were very similar. The capacity to scavenge ABTS^{•+} radicals was higher in "Gruesa" aqueous extracts than those obtained with ethanol and acetone. However, these aqueous extracts showed no activity against DPPH[•] radicals. This activity was similar to that obtained by Lopez et al. (2008) for artichoke by-products (0.15–0.95 g TE/100 g by-product), by Xu et al. (2008) for citrus fruits peel (0.6–0.9 g TE/100 g DW by-product) or by Red and Long (2007) for star fruit residue (3.4 g AE/100 g DW or 5.2 g TE/100 g DW). Water pH (ranging between 3.0 and 8.0) did not affect scavenging activity. Prolonging extraction times (from 1 to 120 min), at 25 °C, for extracts obtained using methanol, ethanol, acetone, methanol:water, ethanol:water or acetone:water did not lead to higher DPPH[•] scavenging. At 55 °C, the increase in extraction time doubled the antioxidant activity of the extracts obtained with acetone. An extraction time of 120 min did not change the

antioxidant activity against ABTS^{•+} radicals, except for the "Gruesa" cultivar, for which an increase in extraction time led to the highest activity for the extracts obtained using ethanol or the lowest activity for the extracts obtained using acetone. The antioxidant activity of aqueous extracts decreased significantly (from 20% to 90%) when the extraction time was increased from 1 to 120 min, probably due to polyphenol oxidase, which was not inactivated in the aqueous extracts (the brown hue observed in those extracts increased with extraction time). Increasing the extraction temperature did not change the antioxidant activity of extracts obtained with methanol or ethanol:water. However, as extraction temperature increased (when the extraction was done at 120 min), the capacity of extracts from both cultivars obtained using acetone and that of the "Gruesa" cultivar in ethanol, acetone, methanol:water or acetone:water to scavenge DPPH[•] radicals increased. Also the scavenging of ABTS^{•+} radicals increased significantly when the extraction temperature was increased from 25 to 55 °C (120 min) in extracts of methanol, ethanol or acetone and in extracts of ethanol:water and acetone:water of the "Gruesa" cultivar. The antioxidant activity of aqueous extracts was also affected by extraction temperature. So, extraction at 55 °C (120 min) reduced the antioxidant activity of extracts by more than 50% (relative to extraction at 25 °C for 120 min). In aqueous extracts, at this extraction temperature (55 °C), polyphenol oxidase was not inactivated (thermal inactivation occurs at temperatures higher than 70 °C); this was evident from the brown hue observed in those extracts. The fact that this enzyme shows greatest activity at around 40 °C could explain the decrease in antioxidant activity that occurred when extraction temperature increased from 25 to 55 °C.

The highest antioxidant activity obtained using the TBARS method (Fig. 1) was found for aqueous extracts, followed by extracts in acetone:water. On the other hand, the lowest inhibition was observed for extracts obtained with the less polar solvents, ethanol and acetone and the mixtures of those solvents with water. The percentage of inhibition shown in this work for aqueous extracts is similar to values reported in the literature (Monte et al., 2008; Singh et al., 2008; Singh et al., 2008; Singh et al., 2008; Singh et al., 2008), although comparison is highly difficult because of the different extraction conditions used. The inhibition of lipid peroxidation tended to decrease when water pH was higher than 6.0. All the extracts obtained at 25 or 55 °C for 1 min were capable of preventing TBARS formation. However, when extraction time was increased, the antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts

Table 2
Comparison of the capacity of banana peel extracts to scavenge DPPH radicals.

Extraction solvent	"Grande Naine"				"Gruasa"			
	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min
Antioxidant capacity (g Trolox equivalents/100 g DW)								
Methanol	1.9 ± 0.4 ^b	2.4 ± 0.4 ^b	1.8 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.5 ^b	2.2 ± 0.3 ^b	1.6 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b
Ethanol	0.56 ± 0.02 ^d	0.45 ± 0.11 ^{de}	0.58 ± 0.07 ^{de}	0.59 ± 0.12 ^d	0.59 ± 0.01 ^{de}	0.50 ± 0.09 ^{de}	0.52 ± 0.02 ^{de}	0.80 ± 0.05 ^{de}
Acetone	0.13 ± 0.01 ^{de}	0.16 ± 0.03 ^{de}	0.12 ± 0.01 ^{de}	0.25 ± 0.02 ^{de}	0.11 ± 0.01 ^{de}	0.14 ± 0.02 ^{de}	0.12 ± 0.01 ^{de}	0.25 ± 0.02 ^{de}
Water	0.22 ± 0.02 ^{de}	0.040 ± 0.004 ^{de}	0.23 ± 0.01 ^{de}	0.018 ± 0.004 ^{de}	–	–	–	–
Methanol:water (1:1)	0.95 ± 0.10 ^d	0.85 ± 0.11 ^d	0.88 ± 0.05 ^d	0.88 ± 0.06 ^d	0.80 ± 0.01 ^d	0.52 ± 0.04 ^{de}	0.88 ± 0.13 ^{de}	0.94 ± 0.20 ^{de}
Ethanol:water (1:1)	1.2 ± 0.2 ^d	1.1 ± 0.1 ^d	1.2 ± 0.1 ^d	1.3 ± 0.1 ^d	0.78 ± 0.03 ^d	0.70 ± 0.08 ^d	0.82 ± 0.13 ^d	0.85 ± 0.18 ^d
Acetone:water (1:1)	2.9 ± 0.4 ^d	3.1 ± 0.5 ^d	3.0 ± 0.6 ^d	3.1 ± 0.4 ^d	3.3 ± 0.3 ^d	2.1 ± 0.2 ^{de}	2.8 ± 0.6 ^{de}	3.2 ± 0.4 ^{de}
Antioxidant capacity (g ascorbic acid equivalents/100 g DW)								
Methanol	1.6 ± 0.3 ^b	2.0 ± 0.4 ^b	1.5 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.4 ^b	1.9 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.1 ^b
Ethanol	0.43 ± 0.02 ^d	0.35 ± 0.09 ^{de}	0.45 ± 0.05 ^{de}	0.45 ± 0.09 ^d	0.45 ± 0.01 ^{de}	0.38 ± 0.07 ^{de}	0.41 ± 0.02 ^{de}	0.62 ± 0.04 ^{de}
Acetone	0.093 ± 0.004 ^{de}	0.11 ± 0.02 ^{de}	0.092 ± 0.004 ^{de}	0.18 ± 0.02 ^{de}	0.080 ± 0.009 ^{de}	0.10 ± 0.01 ^{de}	0.084 ± 0.004 ^{de}	0.18 ± 0.02 ^{de}
Water	0.16 ± 0.02 ^{de}	0.030 ± 0.003 ^{de}	0.17 ± 0.01 ^{de}	0.013 ± 0.003 ^{de}	–	–	–	–
Methanol:water (1:1)	0.80 ± 0.08 ^d	0.72 ± 0.09 ^d	0.75 ± 0.05 ^d	0.74 ± 0.05 ^d	0.68 ± 0.01 ^d	0.44 ± 0.03 ^{de}	0.75 ± 0.11 ^{de}	0.79 ± 0.17 ^{de}
Ethanol:water (1:1)	1.0 ± 0.2 ^d	0.91 ± 0.07 ^d	1.0 ± 0.1 ^d	1.1 ± 0.1 ^d	0.66 ± 0.03 ^d	0.59 ± 0.07 ^d	0.69 ± 0.11 ^d	0.72 ± 0.15 ^d
Acetone:water (1:1)	2.4 ± 0.3 ^d	2.6 ± 0.4 ^d	2.6 ± 0.5 ^d	2.6 ± 0.4 ^d	2.8 ± 0.2 ^d	1.8 ± 0.1 ^{de}	2.3 ± 0.5 ^{de}	2.7 ± 0.3 ^{de}
Scavenging percentage (%)								
Methanol	36 ± 7 ^b	44 ± 8 ^b	33 ± 2 ^b	36 ± 1 ^b	33 ± 8 ^b	42 ± 5 ^b	29 ± 3 ^b	37 ± 1 ^b
Ethanol	10 ± 1 ^{de}	8.0 ± 2.0 ^{de}	10 ± 1 ^{de}	10 ± 2 ^d	10 ± 1 ^{de}	8.8 ± 1.6 ^{de}	9.3 ± 0.4 ^{de}	14 ± 1 ^{de}
Acetone	2.5 ± 0.1 ^{de}	3.0 ± 0.5 ^{de}	2.5 ± 0.1 ^{de}	4.8 ± 0.4 ^{de}	2.1 ± 0.2 ^{de}	2.7 ± 0.4 ^{de}	2.3 ± 0.1 ^{de}	4.8 ± 0.4 ^{de}
Water	2.8 ± 0.3 ^{de}	0.52 ± 0.08 ^{de}	3.0 ± 0.1 ^{de}	0.23 ± 0.01 ^{de}	–	–	–	–
Methanol:water (1:1)	18 ± 2 ^d	16 ± 2 ^d	17 ± 1 ^d	17 ± 1 ^d	15 ± 1 ^d	10 ± 1 ^{de}	16 ± 2 ^d	18 ± 4 ^d
Ethanol:water (1:1)	24 ± 3 ^d	20 ± 2 ^d	23 ± 2 ^d	24 ± 2 ^d	14 ± 1 ^d	13 ± 1 ^d	15 ± 3 ^d	16 ± 3 ^d
Acetone:water (1:1)	55 ± 9 ^d	58 ± 9 ^d	56 ± 11 ^d	60 ± 9 ^d	61 ± 5 ^d	39 ± 4 ^d	51 ± 10 ^{de}	60 ± 7 ^d

Values are the mean ± standard deviation of at least three determinations (n = 3–9). Within a column (a–f) or a row (A–C), different letters denote significant differences (p < 0.050) between extraction solvent or extraction conditions (temperature and time), respectively.

Table 3
Comparison of the capacity of banana peel extracts to scavenge ABTS radicals.

Extraction solvent	"Grande Naine"				"Gruasa"			
	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min
Antioxidant capacity (g Trolox equivalents/100 g DW)								
Methanol	2.4 ± 0.6 ^b	1.6 ± 0.1 ^{bc}	2.9 ± 0.3 ^{ab}	3.1 ± 0.1 ^{ab}	2.7 ± 0.4 ^{ab}	1.7 ± 0.2 ^{cd}	2.4 ± 0.2 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^{cd}
Ethanol	0.40 ± 0.01 ^{cd}	0.35 ± 0.01 ^{cd}	0.46 ± 0.01 ^{cd}	0.75 ± 0.05 ^{ab}	0.31 ± 0.04 ^{cd}	0.49 ± 0.06 ^{cd}	0.21 ± 0.03 ^{cd}	0.59 ± 0.05 ^{cd}
Acetone	0.34 ± 0.01 ^{cd}	0.28 ± 0.01 ^{cd}	0.33 ± 0.01 ^{cd}	0.70 ± 0.05 ^{ab}	0.26 ± 0.01 ^{cd}	0.12 ± 0.01 ^{cd}	0.26 ± 0.03 ^{cd}	0.18 ± 0.01 ^{cd}
Water	0.31 ± 0.01 ^{cd}	0.16 ± 0.02 ^{cd}	0.11 ± 0.03 ^{cd}	0.025 ± 0.011 ^{cd}	0.72 ± 0.22 ^{ab}	0.086 ± 0.006 ^{cd}	0.68 ± 0.15 ^{cd}	–
Methanol:water (1:1)	3.6 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.1 ^b	3.7 ± 0.1 ^b	3.9 ± 0.1 ^b	2.7 ± 0.3 ^b	2.3 ± 0.1 ^b	2.8 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.1 ^b
Ethanol:water (1:1)	3.2 ± 0.2 ^b	3.2 ± 0.2 ^b	3.2 ± 0.1 ^{bc}	3.2 ± 0.1 ^c	2.7 ± 0.3 ^{bc}	2.4 ± 0.2 ^{bc}	3.7 ± 0.4 ^{ab}	4.4 ± 0.2 ^{ab}
Acetone:water (1:1)	7.3 ± 0.6 ^b	8.4 ± 1.3 ^a	7.1 ± 0.6 ^b	7.4 ± 0.1 ^a	9.6 ± 0.2 ^{ab}	6.5 ± 0.3 ^{ab}	8.5 ± 0.3 ^{ab}	9.3 ± 0.7 ^{ab}
Antioxidant capacity (g ascorbic acid equivalents/100 g DW)								
Methanol	1.8 ± 0.4 ^b	1.2 ± 0.1 ^{cd}	2.1 ± 0.3 ^{ab}	2.3 ± 0.1 ^{ab}	2.0 ± 0.3 ^{ab}	1.3 ± 0.1 ^{cd}	1.7 ± 0.2 ^{ab}	1.7 ± 0.1 ^{cd}
Ethanol	0.37 ± 0.01 ^{cd}	0.33 ± 0.01 ^{cd}	0.42 ± 0.01 ^{cd}	0.68 ± 0.04 ^{ab}	0.29 ± 0.04 ^{cd}	0.45 ± 0.05 ^{cd}	0.20 ± 0.02 ^{cd}	0.54 ± 0.04 ^{cd}
Acetone	0.32 ± 0.01 ^{cd}	0.26 ± 0.01 ^{cd}	0.31 ± 0.01 ^{cd}	0.67 ± 0.05 ^{ab}	0.24 ± 0.01 ^{cd}	0.11 ± 0.01 ^{cd}	0.24 ± 0.02 ^{cd}	0.18 ± 0.01 ^{cd}
Water	0.34 ± 0.01 ^{cd}	0.22 ± 0.04 ^{cd}	0.18 ± 0.02 ^{cd}	0.11 ± 0.02 ^{cd}	0.67 ± 0.18 ^{ab}	0.16 ± 0.05 ^{cd}	0.71 ± 0.12 ^{cd}	0.064 ± 0.004 ^{cd}
Methanol:water (1:1)	2.6 ± 0.1 ^b	2.7 ± 0.1 ^b	2.7 ± 0.1 ^b	2.8 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.2 ^b	1.7 ± 0.1 ^b	2.1 ± 0.3 ^b	2.1 ± 0.1 ^b
Ethanol:water (1:1)	2.3 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^{bc}	2.4 ± 0.1 ^c	2.0 ± 0.2 ^{bc}	1.8 ± 0.1 ^{bc}	2.8 ± 0.3 ^{ab}	3.3 ± 0.1 ^{ab}
Acetone:water (1:1)	5.3 ± 0.4 ^b	6.3 ± 0.9 ^a	5.2 ± 0.4 ^b	5.4 ± 0.1 ^a	7.1 ± 0.2 ^{ab}	4.7 ± 0.2 ^{ab}	6.4 ± 0.2 ^{ab}	6.9 ± 0.4 ^{ab}
Scavenging percentage (%)								
Methanol	44 ± 10 ^b	28 ± 1 ^{cd}	50 ± 6 ^{ab}	56 ± 2 ^{ab}	48 ± 8 ^{ab}	29 ± 4 ^{cd}	42 ± 4 ^{ab}	45 ± 1 ^{cd}
Ethanol	11 ± 1 ^{cd}	7.2 ± 0.1 ^{cd}	16 ± 1 ^{cd}	19 ± 1 ^{cd}	9.7 ± 0.7 ^{cd}	11 ± 2 ^{cd}	8.6 ± 0.7 ^{cd}	16 ± 1 ^{cd}
Acetone	2.7 ± 0.6 ^{cd}	2.7 ± 0.2 ^{cd}	2.7 ± 0.2 ^{cd}	13 ± 2 ^{cd}	8.0 ± 0.1 ^{cd}	2.3 ± 0.1 ^{cd}	8.0 ± 0.4 ^{cd}	6.0 ± 0.1 ^{cd}
Water	8.8 ± 0.1 ^{cd}	5.8 ± 0.9 ^{cd}	8.4 ± 0.5 ^{cd}	3.2 ± 0.4 ^{cd}	8.3 ± 0.5 ^{cd}	6.8 ± 1.2 ^{cd}	7.9 ± 0.3 ^{cd}	4.1 ± 1.0 ^{cd}
Methanol:water (1:1)	61 ± 1 ^b	62 ± 1 ^b	63 ± 2 ^b	69 ± 4 ^{ab}	48 ± 5 ^b	40 ± 2 ^b	49 ± 7 ^b	50 ± 2 ^b
Ethanol:water (1:1)	58 ± 1 ^b	56 ± 4 ^c	56 ± 1 ^{bc}	58 ± 1 ^c	47 ± 4 ^b	44 ± 2 ^b	42 ± 4 ^b	52 ± 3 ^b
Acetone:water (1:1)	84 ± 5 ^b	89 ± 7 ^a	82 ± 7 ^b	86 ± 1 ^a	96 ± 1 ^{ab}	75 ± 4 ^{ab}	96 ± 1 ^{ab}	98 ± 1 ^{ab}

Values are the mean ± standard deviation of at least three determinations (n = 3–9). Within a column (a–g) or a row (A–D), different letters denote significant differences (p < 0.050) between extraction solvent or extraction conditions (temperature and time), respectively.

decreased. This behaviour was more remarkable when ethanol was used as the extractant (70–100% decrease) as opposed to methanol (40–100%). Moreover, increasing the extraction temperature (from 25 to 55 °C for 120 min) induced a loss of antioxidant capacity of 100% for both solvents. High temperatures have been reported to improve the efficiency of extraction, due to the enhanced diffusion

rate and solubility of analytes in solvents. However, at high temperatures bioactive compounds with antioxidant activity can react with other components of the plant material, thus impeding extraction. Moreover, it has been widely reported that extraction temperature affects the stability of phenolic compounds, due to chemical and enzymatic degradation, losses caused by volatilisation or thermal

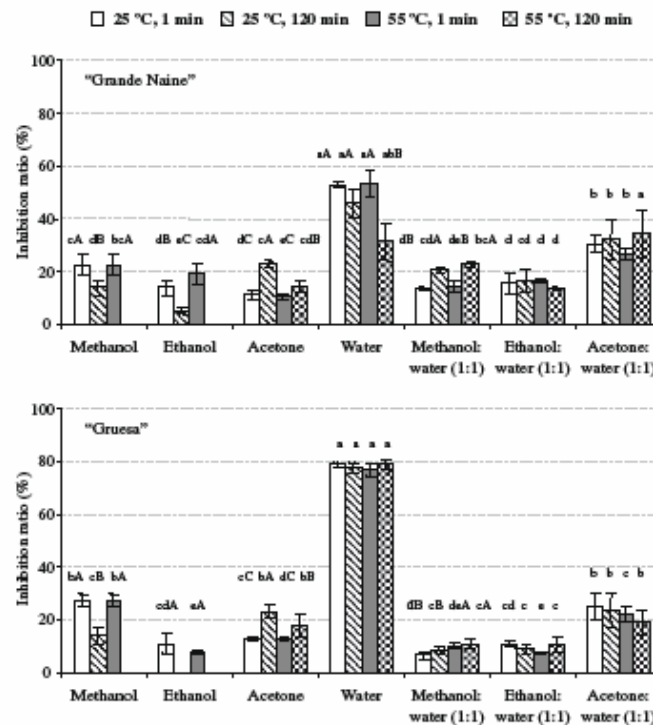


Fig. 1. Comparison of the capacity of banana peel extracts to inhibit the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Each extraction process was done at least in triplicate ($n=3-9$). Different lower or upper case letters denote significant differences ($p < 0.050$) between extraction solvent or extraction conditions (temperature and time), respectively.

decomposition. The temperature increase also diminished the antioxidant activity of extracts in acetone (20–40%) at 120 min. The antioxidant activity of aqueous extracts did not change when using different extraction times (25 °C, 1 or 120 min), while the activity of extracts in acetone tended to increase with longer time (inhibition ratio 2 times higher).

In general, banana peel extracts worked better as antiradical agents than as lipid peroxidation inhibitors, although high antioxidant activity was obtained using all the assays. The extracts prepared with different solvents and different extraction conditions exhibited varying degrees of antioxidant activity. This fact indicates that antioxidants or active compounds of different polarity were present in the extracts.

3.2. Extract yield and bioactive compound determination

Banana peel contains considerable amounts of extractable compounds (Fig. 2). Variation in the yields of various extracts is attributed to the polarities of different compounds present in the fruit by-products. The mixtures (1:1) of water with methanol, ethanol or acetone had a clear ability to extract substances from this by-product. When the extraction was done at 25 or 55 °C for 1 min, the extract yield ranged from 54 ± 4% (methanol:water and acetone:water extraction for "Grande Naine" cultivar and also for ethanol:water extraction for "Gruesa" cultivar) to 3.1 ± 0.6% (acetone

extraction). The extraction efficiency of methanol increased with extraction time (22–86%) and with temperature (33%, for the "Grande Naine" cultivar only) when the extraction was done at 120 min. For ethanolic extracts in the "Gruesa" cultivar, the extract yield increased significantly (1.7 times) when the extraction time was increased from 1 to 120 min (at 25 °C). No significant effects of extraction temperature or time were found for the other solvents. Similar results were obtained by Murthy et al. (2002) in grape pomace, for which methanolic extracts contained 5.6 ± 0.5% of total solids. The contents reported by Singh et al. (2002) are similar to those obtained in this work in extractables from pomegranate peel or seeds (9.4% or 8.6%, respectively). Nevertheless, Pinelo et al. (2005) found a maximum total solid of 44% in ethanolic extracts from grape pomace, whereas values near 30% were found for methanol and water.

Acetone:water (1:1) was the most effective solvent in extraction of total phenolic compounds from banana peels (Table 4). When the extraction was done at 25 °C for 1 min the polyphenol content in acetone:water was 1.5–3.5 times higher than those in methanol, methanol:water or ethanol:water. The content of phenolic compounds in methanolic extracts was similar to what other authors found in banana peel. Someya et al. (2002) determined a phenolic compound content of 0.91 g/100 g DW. Moreover, Nguyen et al. (2003) found phenolic compound contents of 0.9 or 3.0 g/100 g DW in the "Kluai Khai" or "Kluai Hom Thong"

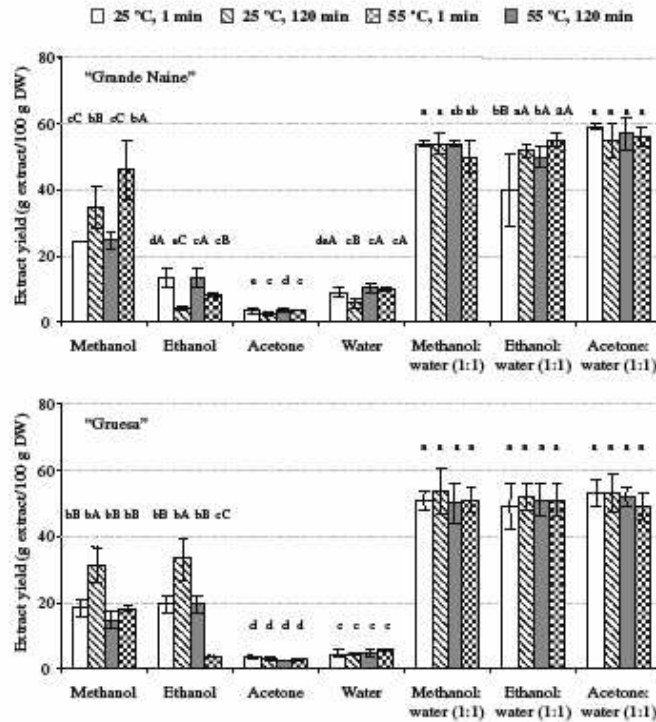


Fig. 2. Extract yield of banana peel extracts. Each extraction process was done at least in triplicate ($n=3-9$). Different lower or upper case letters denote significant differences ($p < 0.050$) between extraction solvent or extraction conditions (temperature and time), respectively.

cultivars, respectively. Notwithstanding the fact that the extract yield was constant, an increase (around 50%) in the recovery of phenolic compounds was observed when the water pH was higher than 4.0. The extraction of phenolic compounds with methanol increased with extraction time (1.5 times) while extraction temperature did not improve the extraction. It has also been reported that raising the extraction temperature from 40 to 100 °C does not yield a higher content of phenolic compounds and stronger antioxidant capacity in extracts obtained from other fruit by-products (Xu et al., 2008). However, for ethanol and acetone the efficiency of the extraction of phenolic compounds increased with temperature (at 120 min). The amount of phenolic compounds increased 1.8–2.6 times when ethanol was used as extractant solvent and the temperature increased from 25 to 55 °C. Higher yields were obtained with acetone when the temperature was increased, increasing 5.5 times for “Grande Naine” and 1.8 times for “Gruesa” cultivar. The ratio of total phenolic compounds to the total extractable compounds ranged from 0.30% to 20%. This meant that in all cases between 80% and almost 100% of the extractable compounds were not phenolic compounds. Methanol, ethanol, acetone and mixtures of those solvents with water had similar efficiencies in extracting phenolic compounds from banana peel. Water extracted the least amount of phenolic compounds (0.30–2.0% of the extractable compounds).

Choosing the appropriate solvent is one of the most important factors in obtaining extracts with a high content of bioactive com-

pounds. In general, the highly hydroxylated aglycone forms of phenolic compounds are soluble in alcohols such as ethanol and methanol (Arts & Hollman, 1998). Less polar solvents such as ethyl acetate, acetone and chloroform are used for the less polar and the highly methoxylated aglycone forms that are very common in fruit skin (Lafka et al., 2007). The most polar phytochemical compounds can be extracted using water. The results obtained coincide with reports that the mixture acetone:water is an effective solvent for extracting phenolic compounds from fruit by-products (Shui & Leong, 2006; Wolfe, Wu, & Liu, 2003). Moreover, phenolic compound content was comparable to the content described in the literature for other extracts of fruit by-products (Lafka et al., 2007; Shui & Leong, 2006). However, other authors have reported that the by-products of other plants such as artichoke (Horach et al., 2002), pomegranate (Singh et al., 2002) and grape (Murthy et al., 2002) have 10–20 times more phenolic compounds. The low recovery of phenolic compounds obtained with water could be caused by the oxidation of phenolic compounds by polyphenol oxidase, whereas in methanol, ethanol and acetone the enzyme is inactivated. Therefore, aqueous extracts had a brown hue not observed in extracts obtained using the other solvents. The increase in temperature (from 25 to 55 °C) assayed was not sufficient to inactivate polyphenol oxidase in aqueous extracts.

The extracts obtained with acetone:water contained anthocyanins. When acetone:water extractions were carried out for 1 min (25 and 55 °C), the amount remained between 404 ± 111 and

Table 4
Total phenolic compounds and dopamine and L-dopa content of banana peel extracts.

Extraction solvent	"Grande Naine"				"Gruesa"			
	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min	25 °C, 1 min	25 °C, 120 min	55 °C, 1 min	55 °C, 120 min
Total extractable phenolic compounds (g gallic acid equivalents/100 g DW)								
Methanol	1.4 ± 0.3 ^{ab}	1.8 ± 0.2 ^{ab}	1.4 ± 0.1 ^{ab}	1.8 ± 0.1 ^{ab}	1.4 ± 0.3 ^{bc}	1.9 ± 0.3 ^{ab}	1.2 ± 0.1 ^{bc}	1.6 ± 0.1 ^{ab}
Ethanol	0.31 ± 0.00 ^{ab}	0.23 ± 0.01 ^{ab}	0.30 ± 0.04 ^{ab}	0.53 ± 0.01 ^{ab}	0.29 ± 0.06 ^{ab}	0.35 ± 0.01 ^{ab}	0.27 ± 0.06 ^{ab}	0.68 ± 0.06 ^{ab}
Acetone	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.16 ± 0.03 ^{ab}	0.12 ± 0.01 ^{ab}	0.88 ± 0.13 ^a	0.10 ± 0.01 ^{bc}	0.13 ± 0.01 ^{ab}	0.10 ± 0.01 ^{bc}	0.24 ± 0.01 ^{ab}
Water	0.18 ± 0.01 ^{ab}	0.092 ± 0.019 ^{ab}	0.20 ± 0.01 ^{ab}	0.031 ± 0.006 ^{bc}	0.29 ± 0.02 ^{ab}	0.19 ± 0.01 ^{ab}	0.32 ± 0.03 ^{ab}	0.13 ± 0.01 ^{ab}
Methanol:water (1:1)	1.6 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.1 ^{bc}	1.7 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.1 ^{ab}	1.2 ± 0.1 ^{ab}	1.5 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.2 ^{ab}
Ethanol:water (1:1)	1.7 ± 0.3 ^b	1.8 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.3 ^{ab}	1.5 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.2 ^{ab}	2.9 ± 0.3 ^{ab}
Acetone:water (1:1)	2.6 ± 0.6 ^a	2.8 ± 0.7 ^a	2.6 ± 0.3 ^a	3.1 ± 0.4 ^a	4.7 ± 0.7 ^{ab}	3.2 ± 0.2 ^{ab}	3.8 ± 0.2 ^{ab}	3.8 ± 0.5 ^{ab}
Dopamine (mg/100 g DW)								
Methanol	265 ± 52 ^{ab}	334 ± 10 ^a	373 ± 16 ^{ab}	381 ± 36 ^{ab}	288 ± 18 ^{ab}	342 ± 22 ^a	325 ± 11 ^{ab}	339 ± 20 ^{ab}
Ethanol	157 ± 27 ^{bc}	148 ± 36 ^{bc}	161 ± 6 ^c	204 ± 53 ^b	150 ± 25 ^b	136 ± 15 ^c	148 ± 20 ^b	166 ± 13 ^c
Acetone	95 ± 13 ^d	110 ± 2 ^d	92 ± 18 ^d	120 ± 34 ^c	88 ± 4 ^c	96 ± 10 ^c	85 ± 9 ^c	101 ± 25 ^c
Water	4.2 ± 0.1 ^e	4.5 ± 0.5 ^e	4.7 ± 0.3 ^e	4.8 ± 0.3 ^d	3.8 ± 0.2 ^d	3.5 ± 0.3 ^d	4.0 ± 0.5 ^d	3.9 ± 0.4 ^d
Methanol:water (1:1)	153 ± 4 ^{ab}	139 ± 10 ^b	167 ± 9 ^{ab}	115 ± 9 ^c	148 ± 2 ^b	106 ± 6 ^c	158 ± 4 ^b	143 ± 40 ^c
Ethanol:water (1:1)	203 ± 8 ^{ab}	173 ± 9 ^{ab}	217 ± 14 ^{ab}	195 ± 20 ^{ab}	177 ± 35 ^b	173 ± 7 ^b	184 ± 27 ^b	239 ± 7 ^b
Acetone:water (1:1)	172 ± 1 ^{bc}	172 ± 7 ^b	190 ± 45 ^{bc}	197 ± 12 ^b	117 ± 26 ^{ab}	112 ± 30 ^{ab}	140 ± 13 ^{ab}	201 ± 27 ^{ab}
L-dopa (mg/100 g DW)								
Methanol	30 ± 1 ^{ab}	17 ± 1 ^{bc}	21 ± 1 ^{bc}	28 ± 6 ^{ab}	28 ± 2 ^{ab}	19 ± 5 ^{ab}	26 ± 3 ^{ab}	34 ± 3 ^{ab}
Ethanol	16 ± 3 ^c	12 ± 1 ^d	13 ± 2 ^c	12 ± 1 ^d	11 ± 4 ^c	13 ± 2 ^b	14 ± 5 ^c	13 ± 4 ^c
Acetone	12 ± 1 ^{ab}	11 ± 2 ^{ab}	9.4 ± 2.3 ^{ab}	18 ± 4 ^{ab}	9.3 ± 0.7 ^c	8.8 ± 0.5 ^c	7.9 ± 0.6 ^d	8.0 ± 0.4 ^d
Water	8.1 ± 0.5 ^{ab}	6.7 ± 0.6 ^{ab}	8.8 ± 1.4 ^a	5.1 ± 0.5 ^{bc}	4.3 ± 0.5 ^d	4.3 ± 0.3 ^d	4.5 ± 0.6 ^d	4.8 ± 0.3 ^d
Methanol:water (1:1)	30 ± 1 ^{ab}	43 ± 1 ^{ab}	38 ± 5 ^{ab}	30 ± 1 ^{ab}	45 ± 4 ^a	35 ± 6 ^a	53 ± 6 ^a	53 ± 7 ^a
Ethanol:water (1:1)	33 ± 2 ^{bc}	35 ± 3 ^{bc}	38 ± 3 ^{ab}	49 ± 1 ^{ab}	46 ± 4 ^{ab}	41 ± 2 ^{ab}	47 ± 1 ^{ab}	63 ± 1 ^{ab}
Acetone:water (1:1)	31 ± 3 ^{ab}	34 ± 1 ^{ab}	36 ± 4 ^{ab}	56 ± 5 ^{ab}	56 ± 4 ^{ab}	43 ± 4 ^c	58 ± 6 ^{ab}	88 ± 15 ^{ab}

Values are the mean ± standard deviation of at least three determinations (n = 3–9).

Within a column (a–f) or a row (A–C), different letters denote significant differences (p < 0.050) between extraction solvent or extraction conditions (temperature and time), respectively. The absence of lower case or capital letters after values indicates any significant differences.

465 ± 78 µg cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g DW banana peel. However, the extraction of these compounds decreased (20–35%) when the extraction was done at 55 °C for a longer period of time (120 min). These amounts were much lower than those described by Lapornik et al. (2005) for redcurrant, blackcurrant and grape by-products and by Wolfe et al. (2003) for apple peels. An amount of 139 ± 37 µg cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g DW banana peel was detected in the extracts in acetone when the extraction was done at 25 and 55 °C for 1 min. Moreover, a negligible amount of total monomeric anthocyanins of 27 ± 9 µg cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g DW was detected in methanolic extracts. In the other extracts anthocyanins were not detected (detection limit (DL), 10 µg cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g DW).

Banana peel contained large amounts of dopamine and L-dopa, catecholamines with a significant antioxidant activity (Table 4). This strong activity is related to their o-dihydroxy structure and its amino residue facilitates their hydrophilic character (Kanazawa & Sakakibara, 2000). Extracts obtained with methanol had the highest dopamine content, compared with the other solvents assayed by a factor ranging between 1.5–3.0 (methanol:water, ethanol:water, acetone:water or ethanol) and 65–98 (water). The dopamine content increased significantly when the extraction time was increased from 1 to 120 min (at 25 °C) for methanolic extracts and when the extraction temperature was increased from 25 to 55 °C for extracts obtained with acetone:water. Varying extraction temperature or time when using other solvents revealed no significant changes in dopamine content of the extracts. The metabolising precursor of dopamine (L-dopa) was less abundant than dopamine in banana peel; methanol:water, ethanol:water and acetone:water extracts contained the largest amounts of this catecholamine. On the other hand, the lowest L-dopa content was found in extracts obtained with water. The extraction of this compound increased (1.5–1.8 times) when the extraction temperature increased from 25 to 55 °C for 120 min, with ethanol:water and acetone:water. The catecholamine contents reported by Kanazawa &

Sakakibara (2000) from the peel of ripe (*Musa acuminata* Colla AAA) bananas were much lower (80–560 mg dopamine/100 g fresh peel and 1.1–8.0 mg L-dopa/100 g fresh peel) than those obtained in this work.

Other bioactive compounds that were assayed as potentially responsible for the antioxidant activity of banana peels extracts, such as ascorbic acid (DL, 100 µg ascorbic acid/100 g DW), tocopherols (DL, 500–1000 µg/100 g DW) or phytosterols (DL, 300–400 µg/100 g DW), were not detected in the extracts under the extraction conditions used in this work (solvent, water pH, temperature, time and cultivar).

4. Conclusions

There is a great deal of antioxidant activity in banana peel and it could be a very inexpensive source of extracts rich in bioactive compounds, as previously suggested by Someya et al. (2002). Extracting banana peel with acetone:water was not only very efficient but also produced extracts with high antioxidant capacity, as confirmed by various model systems. This may be due to variation in the quality and quantity of phenolic compounds and other bioactive compounds present in the different extracts, such as catecholamines and anthocyanins (ascorbic acid, tocopherols and phytosterols were not detected). The antioxidant activities of banana peel extracts obtained from different cultivars ("Grande Naine" and "Gruesa") were similar. However, the impact of other extraction conditions, such as time or temperature, should be studied in greater depth. Further work is also required for the isolation and characterisation of individual phenolic compounds present in various extracts, to determine the mechanisms involved in the antioxidant capacity of these by-product extracts.

Acknowledgements

M. González would like to thank the INIA for awarding the contract within the framework of the "Recursos y Tecnologías Agrarias

del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000–2003” strategic action, financed with the involvement of the European Social Fund. This research was supported through the I+D+i project RTA2005-00187.

References

- Abidi, S. L. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935, 173–201.
- Annadurai, G., Juang, R. S., & Lee, D. J. (2002). Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 92(3), 263–274.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244.
- Ans, I. C. W., & Holliman, P. C. H. (1998). Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5155–5162.
- Becker, E. M., Nissen, L. R., & Silbsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219(6), 561–571.
- Clarke, W. P., Radidge, P., Lai, E., Jensen, P. D., & Hardin, M. T. (2008). Digestion of waste bananas to generate energy in Australia. *Waste Management*, 28(3), 527–533.
- Emaga, T. H., Andrianaivo, R. H., Wathelet, B., Tchango, J. T., & Paquot, M. (2007). Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry*, 103(2), 590–600.
- Emaga, T. H., Ronkar, S. N., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*, 108(2), 463–471.
- Essien, J. P., Akpan, E. J., & Essien, E. P. (2005). Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. *Bioresour. Technology*, 96(13), 1451–1456.
- European Union. (1999). Council Directive 1999/31/EC of 26 April 1999 on the landfill of waste. *Official Journal of the European Communities*, L182.
- Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N., & Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309–316.
- González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery by-products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 234–238.
- Kanazawa, K., & Sakaiibara, H. (2000). High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 844–848.
- Knapp, F. F., & Nicholas H. J. (1969). Sterols and triterpenes of banana peel. *Phytochemistry*, 8(1), 207–214.
- Lafla, T. I., Sinanoglu, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1205–1214.
- Lapornik, B., Pusek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214–222.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of the AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Llorach, R., Esplà, J. C., Tomás-Barbado, F. A., & Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3458–3464.
- Murthy, K. N. C., Singh, R. P., & Jayapalasha, G. K. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5909–5914.
- Nguyen, T. B. T., Kessa, S., & van Doorn, W. G. (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2), 187–193.
- Owewa, C. F. I., Adetayo, P. O., & Abdami, C. A. (1997). Use of household wastes and crop residues in small ruminant feeding in Nigeria. *Small Ruminant Research*, 24(3), 233–237.
- Pineo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Nñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111–2117.
- Pyka, A., & Sliwicki, J. (2001). Chromatographic separation of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 935, 71–76.
- Seymour, G. B. (1993). Banana. In G. Seymour, J. Taylor, & G. Tucker (Eds.), *Biochemistry of fruit ripening* (pp. 95–98). London: Chapman and Hall.
- Singh, R. P., Murthy, K. N. C., & Jayapalasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81–86.
- Someya, S., Yoshiki, Y., & Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 79(3), 351–354.
- Subagio, A., Modra, N., & Sawada, S. (1996). Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peel. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 43(5), 553–566.
- Shui, G., & Leong, I. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97(2), 277–284.
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609–614.
- Xu, G. H., Chen, J. C., Liu, D. H., Zhang, Y. H., Jiang, P., & Ye, X. Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, 73(1), C11–C18.
- Zydrón, M., Bamasowski, J., Bialkowski, J., & Baranowska, I. (2005). HPLC-FL/ED in the analysis of biogenic amines and their metabolites in urine. *Separation Science and Technology*, 40, 3137–3148.

Perennial forage legumes endemic to the Canary Islands: collection and *ex situ* conservation

I. R. Guma · A. Santos-Guerra ·
J. A. Reyes-Betancort · M. A. Padrón-Mederos ·
P. Méndez · R. González-Montelongo

Received: 12 August 2010 / Accepted: 11 October 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Several perennial legumes endemic to the Canary Islands have been recognized as forage resources for semi-arid zones. In the period 2008–2010, seed collecting missions focused on the genera *Adenocarpus* DC., *Bituminaria* Heist. ex Fabr., *Chamaecytisus* Link, *Cicer* L., *Genista* L., *Telme* Medik. and *Vicia* L. were carried out in the archipelago. Sixty-nine samples were gathered from 31 endemic taxa, eight of which are threatened. These accessions are conserved at the gene bank of the Instituto Canario de Investigaciones Agrarias for further characterization and evaluation. Collection and *ex situ* conservation contribute to preserve endemic legumes genetic resources for utilization in the Canary Islands and in other semi-arid regions of the world.

Keywords Canary Islands · Collection · Endemism · *Ex situ* conservation · Forage legumes · Genetic resources

I. R. Guma (✉) · A. Santos-Guerra ·
J. A. Reyes-Betancort · M. A. Padrón-Mederos ·
R. González-Montelongo
Unidad de Botánica Aplicada, Instituto Canario de
Investigaciones Agrarias, Jardín de Aclimatación de La
Orotava, C/Retama 2, 38400 Puerto de la Cruz, Santa
Cruz de Tenerife, Spain
e-mail: rguma@icia.es; msanaguma@gmail.com

P. Méndez
Unidad de Producción Animal, Pastos y Forrajes, Instituto
Canario de Investigaciones Agrarias, Apartado 60, 38200
La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain

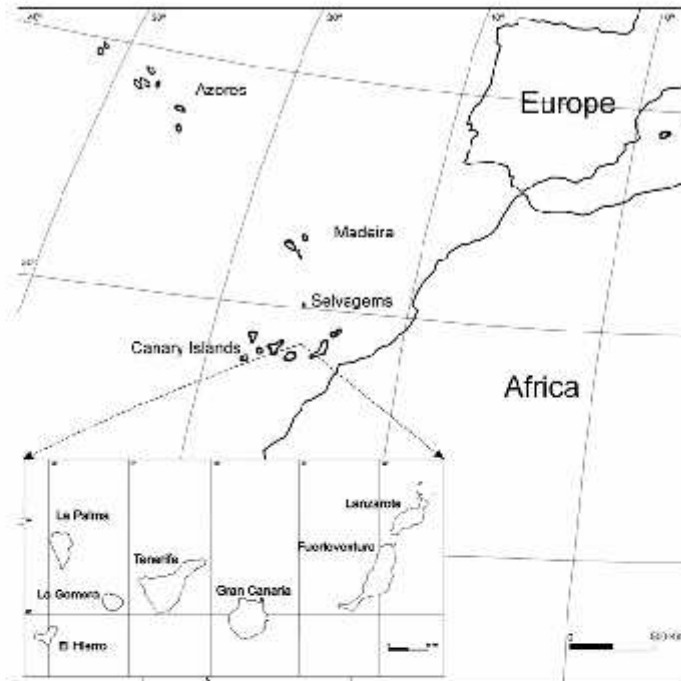
Introduction

The Canary Islands comprise seven volcanic islands together with a number of smaller islets located close to the north-west coast of Africa (Fig. 1). According to the biogeographic classification of Rivas-Martínez (2007), the Canary Islands constitute a province within the Canario-Madeirense Subregion (Mediterranean Region), with two sub-provinces distinguished: the Eastern Canaries (Lanzarote, Fuerteventura and their associated islets, also including Selvagens Islands from Portugal) and the Western Canaries (Gran Canaria, Tenerife, La Gomera, La Palma and El Hierro).

The endemic flora of the archipelago is extremely rich, with over 680 endemic taxa (species, subspecies and varieties) currently recognized that collectively account for more than 50% of the total native flora (Reyes-Betancort et al. 2008). But unfortunately, this richness is increasingly threatened as a consequence of fragmentation, alteration and habitat loss, mainly as a result of activities associated with urbanization, clearing for crops, unsustainable grazing practices and introduction of exotic plants and animals. Moreover, the Canary Islands provide examples of species in risk of extinction caused primarily by human pressure on ecosystems (see Francisco-Ortega et al. 2009).

One hundred and ninety eight endemic spermatophytes representing more than 25% of the endemic flora, are currently included on the Canary Islands Protected Species Catalogue (Gobierno de Canarias

Fig. 1 Geographical position of the Canary Islands (Spain)



2010) of which 151 are included in the Atlas y Libro Rojo de la Flora Amenazada de España (Bañares et al. 2004, 2007, 2009) that covers all of Spain.

An extensive network of protected areas (covering approximately 40% of archipelago's area) has been established to conserve the unique and vulnerable flora, vegetation, landscapes and culture of the Canary Islands (Gobierno de Canarias 2001). Even when the implementation of *in situ* conservation strategies within these protected habitats could be considered the primary way to preserve biodiversity, it alone cannot guarantee long-term security for a particular species. Therefore, *ex situ* conservation should be practiced as an effective complementary tool in order to provide a safety back-up to respond to unforeseen environmental changes. Thus, it is important to apply a combination of *in situ* and *ex situ* strategies to ensure not only diversity conservation but also to make germplasm easily available for evaluation and use.

The Canary Islands flora is especially rich in leguminous species which are found colonizing a great diversity of habitats in a wide altitudinal range (0–3,500 m above sea level). In particular, perennial legumes play essential roles in agro-ecosystems of semi-arid zones in the archipelago, where they constitute indispensable feed resources for livestock mainly during dry summer period. Besides, these plants contribute to prevent soil erosion and to restore and regenerate degraded areas because of their rapid growth, drought tolerance and ability for nitrogen fixation (see Pérez de Paz et al. 1986; Santamaría et al. 1997; Chinae et al. 2007).

Several leguminous shrubs native to Canary Islands have been studied as a source of animal forage: *Adenocarpus foliolosus* (Aiton) DC. var. *foliolosus* (Ventura et al. 2004); *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton var. *crassiuscula* Méndez, Fernández et Santos, *B. bituminosa* var. *albomarginata* Méndez, Fernández et Santos (Méndez et al. 2006, Ventura et al.

2009); *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) Link subsp. *proliferus* var. *palmensis* (Christ) A. Hansen et Sunding (Ventura et al. 2002); *Telme canariensis* (L.) Webb et Berthel., *Telme osyroides* (Svent.) P.E. Gibbs et Dingwall subsp. *osyroides* and *T. osyroides* subsp. *sericea* (Kuntze) del Arco (Chinea et al. 2007); *Telme stenopetala* (Webb et Berthel.) Webb et Berthel. subsp. *stenopetala* and *T. stenopetala* subsp. *sericea* (Pit. et Proust) del Arco (Olea et al. 1994), whereas other species have not been evaluated and could have potential value.

Despite in the archipelago most of perennial leguminous species are endemic (Pérez de Paz et al. 1986) and several taxa are endangered (Gobierno de Canarias 2010), collecting efforts have not been continuous and *ex situ* conservation of these genetic resources in the Canary Islands is limited. Seed banking of Canarian species was undertaken in 1973 through the Artemis project of the Universidad Politécnica de Madrid, aimed at the conservation of endemic species from the Iberian Peninsula and Macaronesia (Gómez-Campo 1986). The Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" and the Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), located in Gran Canaria and Tenerife respectively, have gene banks currently involved in the conservation of the native flora.

The present report summarizes the results of a series of collection missions carried out in the Canary Islands between 2008 and 2010 with the aim of conserving germplasm of 31 endemic perennial legumes belonging to the genera *Adenocarpus* DC., *Bituminaria* Heist. ex Fabr., *Chamaecytisus* Link, *Cicer* L., *Genista* L., *Telme* Medik. and *Vicia* L. Perennial endemic *Lotus* L. species were not included in this survey because they are the subject of other research project currently in progress, concerning the conservation of genetic resources of *Lotus* sect. *Pedrosia* (Lowe) Brand ex Valdés from Macaronesia.

Exploration, collection and conservation

In compliance with autonomous region and local regulations governing access to plant resources, specific permits were obtained for collecting seeds in the Canary Islands.

Collecting missions were carried out during late spring and summer, coinciding with seed ripening time, in the period 2008–2010 within the framework

of the RF2007-00015 project financed by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

The itinerary developed for collecting representative samples of perennial forage legumes (*Adenocarpus*, *Bituminaria*, *Chamaecytisus*, *Cicer*, *Genista*, *Telme* and *Vicia* species) covered a diversity of habitats in the archipelago at different altitudes ranging from 40 to 2,000 m above sea level. At each collecting site mature fruits/seeds were taken from target populations following the basic strategy recommended by Brown and Marshall (1995) modified according to distributional range of the species, habitat diversity, local abundance, population size and amount of ripe seed at the time of collecting. Seeds from all plants sampled within a population were bulked in a labelled paper bag. Geographical location and altitude were recorded using a GPS device. Environmental information on the collection sites and plant characteristics were also recorded. At each collection site a passport data sheet was filled in, and the information was transferred to a database on completion of each expedition.

After cleaning, germination tests were carried out to analyze seed viability following Ellis et al. (1985) procedures. Seeds of the collected species are orthodox so they were dried to low moisture content (5%) and placed in airtight containers stored at -18°C at the gene bank of the ICIA, for further characterization and evaluation. A duplicate will be given to the gene bank of the Centro de Recursos Fitogenéticos (INIA, Spain).

Herbarium voucher specimens were deposited at ORT herbarium, Jardín de Aclimatación de La Orotava, ICIA.

Results and discussion

A total of 69 seed samples belonging to 31 taxa, eight of which are threatened, were collected from Tenerife (38 accessions), La Palma (10 accessions), Gran Canaria (11 accessions), La Gomera (5 accessions) and El Hierro (5 accessions). The results of the collecting missions are summarized in Table 1.

There are five taxa within the genus *Adenocarpus* in the Canary Islands, where they constitute characteristic elements in open areas of the laurel forest, the pine woodland and the subalpine scrub (Lems 1958). The two widespread taxa are *A. viscosus* (Willd.)

Table 1 Accessions collected in the Canary Islands (2008–2010)

Taxon	Local name	N ^a	Location ^b	Threat status ^c
<i>Adenocarpus foliolosus</i> (Aiton) DC. var. <i>foliolosus</i>	Codexo	9	G, P, T	
<i>A. foliolosus</i> (Aiton) DC. var. <i>villosus</i> Webb et Berthel.	Codexo	1	C	
<i>A. viscosus</i> (Willd.) Webb & Berthel. subsp. <i>viscosus</i>	Codexo de cumbre	5	T	
<i>A. viscosus</i> (Willd.) Webb & Berthel. subsp. <i>spartioides</i> Rivas-Mas. et Belmonte	Codexo	1	P	
<i>Blitumaria bluminoza</i> (L.) C. H. Stinton var. <i>albomarginata</i> Méndez, Fernández et Santos	Tedem	2	L	
<i>B. bluminoza</i> (L.) C. H. Stinton var. <i>crassiuscula</i> Méndez, Fernández et Santos	Tedem	2	T	
<i>Chamaecytisus proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>proliferus</i> var. <i>proliferus</i>	Escobón	1	T	
<i>Ch. proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>proliferus</i> var. <i>canariense</i> (Christ) G. Kunkel	Escobón	2	C	
<i>Ch. proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>proliferus</i> var. <i>palmeris</i> (Christ) A. Hansen et Sundling	Tagasaste	2	H, T	
<i>Ch. proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>proliferus</i> var. <i>calderae</i> J. R. Acebes	Tagasaste blanco	2	P	
<i>Ch. proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>proliferus</i> var. <i>hierrensis</i> (Pit.) J. R. Acebes	Escobón	1	H	
<i>Ch. proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>angustifolius</i> (Kuntze) G. Kunkel	Escobón	3	G, T	
<i>Ch. proliferus</i> (L. f.) Link subsp. <i>meridionalis</i> J. R. Acebes	Escobón	2	C	
<i>Cicer canariense</i> A. Santos et G. P. Lewis	Gabancera	2	P, T	IEC
<i>Genista benehoarensis</i> (Bolle ex Svent.) del Arco	Retamón	1	P	IEC; EN B2ab(iii)
<i>Telina canariensis</i> (L.) Webb et Berthel.	Retamón	7	T	
<i>T. microphylla</i> (DC.) P. E. Gibbs et Dingwall	Retama amarilla	2	C	
<i>T. nervosa</i> (Esteve) A. Hansen et Sundling	Gildana pelada	1	C	E*; CR B2ab(ii,iii)
<i>T. oxyrioides</i> (Svent.) P. E. Gibbs et Dingwall subsp. <i>oxyrioides</i>	Retamón	1	T	
<i>T. oxyrioides</i> (Svent.) P. E. Gibbs et Dingwall subsp. <i>sericea</i> (Kuntze) del Arco	Retamón	1	T	
<i>T. pallida</i> (Poir.) G. Kunkel subsp. <i>pallida</i>	Gildana	1	T	IEC; VUD2
<i>T. pallida</i> (Poir.) G. Kunkel subsp. <i>gomerae</i> (P. E. Gibbs et Dingwall) del Arco	Jirdana	1	G	IEC
<i>T. pallida</i> (Poir.) G. Kunkel subsp. <i>silensis</i> del Arco		2	T	E; CR B2ab(iii, v); C2a(ii)
<i>T. splendens</i> (Webb et Berthel.) del Arco	Headanem	1	P	V
<i>T. stenopetala</i> (Webb et Berthel.) Webb et Berthel. subsp. <i>stenopetala</i>	Gacia	2	P	
<i>T. stenopetala</i> (Webb et Berthel.) Webb et Berthel. subsp. <i>microphylla</i> (Pit. & Proust) del Arco	Jirdana, Gacia	1	H	
<i>T. stenopetala</i> (Webb et Berthel.) Webb et Berthel. subsp. <i>sericea</i> (Pit. & Proust) del Arco	Gacia	1	P	
<i>T. stenopetala</i> (Webb et Berthel.) Webb et Berthel. subsp. <i>spachiana</i> (Webb) del Arco	Retamón	1	T	
<i>T. rosmarinifolia</i> Webb et Berthel. subsp. <i>rosmarinifolia</i>	Jirdana	2	C	IEC
<i>Vicia cirrhosa</i> Chr. Sm.	Chicharilla	4	T, H	
<i>V. scandens</i> R. P. Murray	Chicharilla	5	T	

^a Number of accessions^b C Gran Canaria, L Lanzarote, G La Gomera, H El Hierro, P La Palma, T Tenerife^c E extinction risk, V vulnerable, IEC species of interest for Canarian ecosystems (Gobierno de Canarias 2010); CR critically endangered, EN endangered, VU vulnerable [IUCN (2001) criteria for Spain (Balfanz et al. 2004, 2007, 2009)]; E* extinction risk (Ministerio de Medio Ambiente, España 2007)

Webb et Berthel., which was collected in xeric habitats in the subalpine zone of Tenerife (var. *viacosus*) and La Palma (var. *spartioides* Rivas-Mart. et Belmonte), and *A. foliolosus* which was found in more mesic habitats in Tenerife, La Palma, La Gomera (var. *foliolosus*), and Gran Canaria (var. *villosus* Webb & Berthel.).

B. bituminosa, a common native species, has two endemic varieties in the archipelago (Méndez et al. 1991). Seeds of the var. *albomarginata* were collected from populations located in semi-arid habitats of the north of Lanzarote at 250 m of altitude, whilst the var. *crassiuscula* was obtained in a dry area at 1,100 m above sea level in Tenerife.

Cicer canariense A. Santos et G.P. Lewis, a perennial wild relative of chickpea, is a rare and narrowly distributed endemic species. It has been collected in the more humid habitats of the dry bioclimatic belt characteristic of the pine forest (1,400 m above sea level) in Tenerife and La Palma.

The three subspecies and five varieties of *C. proliferus* present in the archipelago (Acebes-Ginové et al. 1991) were sampled in Tenerife [subsp. *proliferus* var. *proliferus* and var. *palmensis* (introduced in this island), and subsp. *angustifolius* (Kuntze) G. Kunkel], Gran Canaria [subsp. *proliferus* var. *canariense* (Christ) G. Kunkel and subsp. *meridionalis*], La Palma [subsp. *proliferus* var. *palmensis* (Christ) A. Hansen et Sunding and var. *calderae* I.R. Acebes], La Gomera (subsp. *angustifolius*) and El Hierro [subsp. *proliferus* var. *hierrensis* (Pit.) I.R. Acebes]. The different taxa were found in a wide altitudinal range, mainly in the pine and laurel forests in the western and central islands.

Genista is represented by a single endemic species, *G. benehoavenis* (Bolle ex Svent.) del Arco, narrowly distributed only in La Palma (Santos Guerra 1975). One accession was obtained from a high elevation zone (above 2,000 m) of this island.

The genus *Telme* is represented by nine endemic species in the archipelago (del Arco Aguilar 1993). Except for *T. rosmarinifolia* Webb et Berthel. subsp. *aurifolia* del Arco, *T. stenopetala* subsp. *paucivoluta* (del Arco) del Arco and *T. salsoloides* del Arco et Acebes, not collected in this survey, 14 taxa (including species and subspecies) were collected in Tenerife [*T. canariensis*, *T. osyrioides* subsp. *osyrioides*, *T. osyrioides* subsp. *sericea*, *T. pallida* (Poir.) G. Kunkel subsp. *pallida*, *T. pallida* subsp. *silensis* del Arco, *T. stenopetala* subsp. *spachiana* (Webb) del

Arco], La Palma [*T. splendens* (Webb et Berthel.) del Arco and *T. stenopetala* subsp. *stenopetala* and *T. stenopetala* subsp. *sericea*], Gran Canaria [*T. microphylla* (DC.) P. E. Gibbs et Dingwall, *T. rosmarinifolia* subsp. *rosmarinifolia* and *T. nervosa* (Esteve) A. Hansen et Sunding] and La Gomera [*T. pallida* subsp. *gomeræ* (P. E. Gibbs et Dingwall) del Arco and *T. stenopetala* subsp. *microphylla* (Pit. et Proust) del Arco]. *Telme* populations were found in a range of habitats in the archipelago. For instance, *T. canariensis* is a prominent component of the open habitats inside the potential area of *Erica* L. and *Myrica* L. communities (*Myrica faya*-*Erica arborea* Oberdorfer) in Tenerife and Gran Canaria; *T. pallida* is relegated to calcareous rocky habitats in the oldest massifs (Anaga and Teno) of Tenerife and La Gomera (del Arco Aguilar 2000) whilst *T. microphylla* grows in a wide altitudinal range from middle lands to the summit, in Gran Canaria.

Two perennial endemic species of *Vicia* were collected: *V. scandens* R. P. Murray in the laurel and *Erica-Myrica* forests at 1,000–1,200 m above sea level in Tenerife and *V. cirrhosa* Chr. Sm. in the Barranco de Bujamé in Teno massif, in the rocky slopes of southern Tenerife, and the forest zone of Linama in El Hierro.

The diversity of legume accessions collected within this project highlights the Canary Islands as an important source of forage plants well adapted to climatic and soil conditions that prevail in the archipelago.

The forage quality of several native legume species has been fully recognized for the Canary Islands but also for other arid regions of the world where they have been evaluated or are currently analyzed, for example *C. proliferus* subsp. *palmensis* in Southern Europe, North Africa, Chile, Australia and New Zealand (Francisco-Ortega et al. 1991; Arredondo et al. 1998; Papanastasis et al. 2008) and *B. bituminosa* var. *albomarginata* in Australia (Real et al. 2009).

Apart from their value as feed for livestock, an increasing interest is being given to legume species from Canary Islands for other purposes than forage use. Thus, several species have been reported to be useful as ornamental plants (e.g. Lucía Sauquillo et al. 1994), as a source of compounds of pharmaceutical interest (e.g. Martínez et al. 2010), for soil erosion control (e.g. China et al. 2007), as a source of resistance to multiple stresses [see Guma et al.

(2010) and references therein] and as alternative pulping raw material for paper industry (e.g. Jiménez et al. 2007).

As the islands ecosystems are very fragile, the importance of conserve native species needs to be emphasized. Furthermore, the Canarian flora contains many species of very restricted distribution and the presence of endangered taxa is significant. Although habitat alteration is perhaps the most important factor in causing decline of native plants richness, the competition for resources with exotic plant invaders (e.g. Kunkel 1976) and the introduction of herbivores (e.g. Garzón-Machado et al. 2010) have a very negative impact on the flora. In this sense, natural habitats preservation and gene banks actions both would contribute to maintain the genetic resources of the archipelago. For this purpose, to determine conservation priorities consideration should be given to the species value from a global perspective, taking into account agronomic potential, abundance, rarity, threats to their habitats from agricultural and urban developments, and environmental issues including climate change.

The accessions obtained during our collecting missions and conserved at the gene bank will provide material for future research programmes aimed to learn more about the nature of these unique species as well as to identify genotypes with potential for their utilization in farming systems of the Canary Islands and in other semi-arid regions of the world.

Acknowledgments This work has been supported by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria and co-financed with FEDER funds (Project RP2007-00015).

References

- Acebes-Ginové JR, del Arco Aguilar M, Wildpret de la Torre W (1991) Revisión taxonómica de *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) Link en Canarias. *Vivera* 20:191–202
- Arredondo S, Ausonson J, Ovalle C, del Pazo A, Avendaño J (1998) Screening multipurpose legume trees in central Chile. *Forest Ecol Manag* 109:221–229
- Bañares A, Blanca G, Gilemes J, Moreno JC, Ortíz S (eds) (2004) Atlas y Libro Rojo de la flora vascular amenazada de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid
- Bañares A, Blanca G, Gilemes J, Moreno JC, Ortíz S (eds) (2007) Atlas y Libro Rojo de la flora vascular amenazada de España. Addenda 2006. Dirección General de Conservación de la Naturaleza—SEBCEP, Madrid
- Bañares A, Blanca G, Gilemes J, Moreno JC, Ortíz S (eds) (2009) Atlas y Libro Rojo de la flora vascular amenazada de España. Addenda 2008. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)—SEBCEP, Madrid
- Brown ADH, Marshall DR (1995) A basic sampling strategy: theory and practice. In: Guarino L, Ramamutha Rao V, Reid R (eds) Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. CAB International, Wallingford, pp 75–92
- China E, García-Ciudad A, Baquín E, García-Ciudad B (2007) Evaluation of endemic leguminous forage shrubs from the Canary Islands. 1. Germplasm characterisation and forage production. *NZ J Agr Res* 50:417–427
- de Gobierno C (2001) Red Canaria de Espacios Naturales Protegidos. <http://www.gobiernodecanarias.org/consuayof/especiesnaturales/index.html>. Accessed 16 Mar 2010
- de Gobierno Canarias (2010) Ley 4/2010, de 4 de junio, del Catálogo Canario de Especies Protegidas. BOC 112: 15200–15225
- del Arco Aguilar M (1993) New combinations in the genus *Teline* Medicus. Typification of *Cytisus pallidus* Poir. *Ein Geobot* 7:519–523
- del Arco Aguilar M (2000) Notes on the taxonomy and nomenclature of *Teline pallida* (Poir.) G. Kunkel. *Taxon* 49:17–25
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1985) Handbook of seed technology for genebanks, vol 1. Principles and methodology. International Board for Plant Genetic Resources, IBPGR, Roma
- Francisco-Ortega J, Jackson MT, Santos-Guerra A, Fernández-Galván M (1991) Historical aspects of the origin and distribution of tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* (L. fl.) Link sp. *palmensis* (Christ) Kunkel), a fodder tree from the Canary Islands. *J Adelaide Bot Gard* 14:67–76
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Bacallado JJ (2009) Canary Islands, Biology. In: Gillespie RG, Clague DA (eds) Encyclopedia of Islands. University of California Press, Berkeley, pp 127–133
- Garzón-Machado V, González-Manchebo JM, Palomares-Martínez A, Acevedo-Rodríguez A, Fernández-Palacios JM, del Arco-Aguilar M, Pérez-de-Paz PL (2010) Strong negative effect of alien herbivores on endemic legumes of the Canary pine forest. *Biol Conserv* 143:2685–2694
- Gómez-Campo C (1986) Proyecto "Artemis". XII. Relación de endemismos recolectados con anterioridad a 30.06.1986. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid
- Gama IR, Padrón-Mederos MA, Santos-Guerra A, Reyes-Betancort JA (2010) Evaluation of methods to remove hardseededness in *Cicer canariense*, a perennial wild relative of chickpea. *Seed Sci Technol* 38:209–213
- Jiménez L, Pérez A, de la Torre MJ, Moral A, Serrano L (2007) Characterization of vine shoots, cotton stalks, *Lycopersicon leucocephala* and *Chamaecytisus proliferus*, and of their ethyleglycol pulps. *Bioresource Technol* 98:487–490
- Kunkel G (1976) Notes on the introduced elements in the Canary Islands flora. In: Kunkel G (ed) Biogeography and ecology in the Canary Islands. W. Junk, The Hague, pp 249–266
- Lens K (1958) Botanical Notes on the Canary Islands. I. Introgression among the species of *Adenocarpus* and their role in the vegetation of the islands. *Bot Inst Nac Invest Agron Madrid* 18:351–370

- Lucía Sanquillo V, del Azo Aguilar M, Acebes Gimovés JR, Pérez de Paz PL, Wildpret de la Torre W (1994) Contribución al estudio de plantas canarias con interés ornamental. *Vieraea* 23:73–107
- Matínez S, Correal E, Real D, Ortuño A, del Río JA (2010) *Bituminaria bituminosa*: a source of furanocoumarins of pharmaceutical interest. In: Govil IN, Singh VK (eds) Recent progress in medicinal plants, vol 27. Drug plants I. Studium Press LLC, India, pp 314–328
- Méndez P, Fernández M, Santos A (1991) Variedades de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stürton (Leguminosae) en el archipiélago canario. *Pastos* 20–21:157–166
- Méndez P, Santos A, Correal E, Ríos S (2006) Agronomic traits as forage crops of nineteen populations of *Bituminaria bituminosa*. *Grassland Sci Eur* 11:300–302
- Ministerio de Medio Ambiente, España (2007) Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. BOE 299:51275–51327
- Olea L, Paredes J, Verdasco M (1994) Evaluation, selection, cultivation techniques and utilization of the shrubs and fodder trees on the semi-arid conditions of the S.W. of Iberian Peninsula. In: Papanastasi V, Stringi L (eds) Fodder trees and shrubs. Cahiers Options Méditerranéennes, vol 4. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, pp 93–100
- Papanastasi VP, Yankoulaki M, Decandia M, Dini-Papanastasi O (2008) Integrating woody species into livestock feeding in the Mediterranean areas of Europe. *Anim Feed Sci Technol* 140:1–17
- Pérez de Paz PL, del Azo Aguilar M, Acebes Gimovés JR, Wildpret de la Torre W (1986) Leguminosas Forrajeras de Canarias. Act. Serie Publ. Científicas, Subser. Mus. Ins. de Cienc. Nat. 2, Excmo. Cabildo Insular de Tenerife, Santa Cruz de Tenerife
- Real D, Correal E, Méndez P, Santos A, Ríos S, Stenberg M, Dini-Papanastasi O, Pecetti L, Tava A (2009) *Bituminaria bituminosa* C.H. Stürton. Grassland species profiles. FAO. http://www.fao.org/ag/AGP/A_GPC/iso/GBASE/new_species/ledera/bitun.htm. Accessed 7 May 2010
- Reyes-Betancort JA, Santos-Guerra A, Gama IR, Humphries CI, Casim MA (2008) Diversity, rarity and the evolution and conservation of the Canary Island endemic flora. *Anal Jardín Bot Madrid* 65:25–45
- Rivas-Martínez S (2007) Mapas de series, geoserias y geomoseras de vegetación de España (Memoria del mapa de vegetación potencial de España). Parte I. *Ins Geobot* 17:1–435
- Santamaría M, Corzo J, León-Barrico M, Gutiérrez-Navarro AM (1997) Characterisation and differentiation of indigenous rhizobia isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. *Plant Soil* 190:143–152
- Santos-Guerra A (1975) Notas corológicas I. *Vieraea* 5:96
- Ventura MR, Castañón JIR, Rey L, Flores MP (2002) Chemical composition and digestibility of Tagasaste (*Chamaecytisus profliferus*) subspecies for goats. *Small Rumin Res* 46:207–210
- Ventura MR, Castañón JIR, Peltain MC, Flores MP (2004) Nutritive value of forage shrubs: *Bituminaria bituminosa*, *Rumex lunaria*, *Acacia salicina*, *Cassia sariii* and *Adenocarpus foiosus*. *Small Rumin Res* 52:13–18
- Ventura MR, Castañón JIR, Méndez P (2009) Effect of season on tedera (*Bituminaria bituminosa*) intake by goats. *Anim Feed Sci Technol* 153:214–319