

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR  
Y GÉNÉTICA

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Estudio preliminar sobre la implicación  
de las proteínas Bmh1 (14-3-3) y Tep1 en  
la regulación del transportador de  
nitrato Ynt1.**

**Preliminary assay about the role of  
Bmh1 (14-3-3) protein and Tep1 in the  
regulation of nitrate transporter Ynt1.**

Trabajo fin de grado

**Lilia E. Plasencia Negrín**

Grado en Biología

Septiembre 2017

## Índice

1	INTRODUCCION .....	1
1.1	El nitrógeno en los seres vivos .....	1
1.2	Asimilación de nitrato en Levaduras .....	2
1.3	Asimilación de nitrato en <i>H. polymorpha</i> .....	3
1.4	Regulación de la asimilación nitrato en <i>H. polymorpha</i> .....	4
1.5	La proteína Bmh1 (14-3-3) .....	5
1.6	La proteína Tep1 .....	6
1.7	Objetivos .....	7
2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
2.1	Microorganismos utilizados .....	7
2.2	Medios y condiciones de cultivo .....	7
2.3	Cultivo de levaduras .....	8
2.4	Determinación de la actividad específica de la Nitrato reductasa (NR).....	9
2.4.1	Obtención de células .....	9
2.4.2	Obtención de extractos libres de células .....	9
2.4.3	Determinación de la actividad nitrato reductasa.....	10
2.4.4	Determinación de las proteínas totales .....	13
2.5	Determinación del nitrito excretado.....	14
2.5.1	Obtención de muestras .....	14
2.5.2	Determinación del nitrito excretado.....	15
2.6	Determinación de la tasa de asimilación de nitrito .....	15
2.6.1	Obtención de células .....	15
2.6.2	Determinación del transporte de nitrito.....	16
2.7	Determinación de la tasa de asimilación de nitrato .....	17
2.7.1	Obtención de células .....	17
2.7.2	Determinación del transporte del nitrato.....	17
3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
3.1	Actividad de la nitrato reductasa y excreción de nitrito en las cepas $\Delta$ bmh1 y WT a diferentes concentraciones de nitrato.....	19
3.2	Asimilación de nitrito .....	24
3.3	Asimilación de nitrato .....	26
4	CONCLUSIONES .....	31
5	REFERENCIAS.....	31

## Resumen

Este trabajo pretende contribuir, en la medida de un Trabajo Fin de Grado, a la comprensión de los complejos mecanismos implicados en la regulación del transportador nitrato (Ynt1) en la levadura *Hansenula polymorpha*. En concreto, nos centramos en estudiar algunos aspectos del papel regulador de la proteína Bmh1 (14-3-3) y Tep1 sobre Ynt1. En este trabajo se determinó la actividad nitrato reductasa y la asimilación de nitrato y nitrito en las cepas  $\Delta bmh1$ ,  $\Delta tep1$  y  $\Delta ynt1$  que se compararon con el WT. La actividad de la nitrato reductasa se determinó como un índice indirecto de transporte de nitrato. En nuestro este laboratorio hemos establecido que de forma general existe una relación inversa entre el transporte de nitrato y la actividad nitrato reductasa.

**Palabras clave:** *H.polymorpha*, nitrato, nitrito, transporte, Ynt1

## Abstract

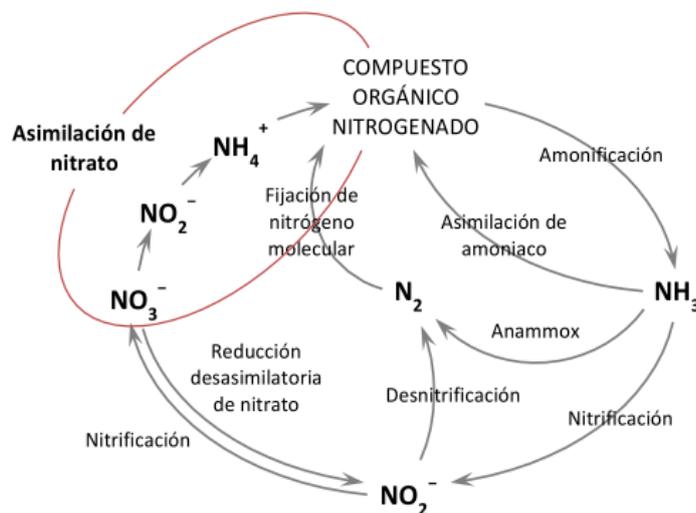
This paper aims to contribute to the understanding of the complex mechanisms involved in the regulation of the nitrate carrier (Ynt1) in *Hansenula polymorpha* yeast. Specifically, we focus on studying some aspects of the regulatory role of the protein Bmh1 (14-3-3) and Tep1 over Ynt1. In this work, the activity of nitrates reductase, the assimilation of nitrates and nitrites in strains  $\Delta bmh1$ ,  $\Delta tep1$  and  $\Delta ynt1$  were determined and compared with WT. The nitrate reductase activity was determined as an indirect nitrate transport index. In our laboratory, we have established that in general there is an inverse relationship between nitrate transport and nitrate reductase activity.

**Key words:** *H.polymorpha*, nitrate, nitrite, transport, Ynt1

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 El nitrógeno en los seres vivos

El nitrógeno es un nutriente ESENCIAL para los seres vivos, forma parte de la estructura de moléculas tan importantes para la vida como, los ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas, y otros compuestos nitrogenados fundamentales para el metabolismo. La mayor reserva de nitrógeno se encuentra en nuestra atmósfera en forma de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), el cual, constituye el 78% del total de los gases atmosféricos. Sin embargo, la mayoría de organismos son incapaces de asimilar el nitrógeno atmosférico, y debe ser fijado por microorganismos antes de que sea fácilmente utilizable por otros organismos (Francis et al., 2007). El ciclo del nitrógeno comienza gracias a la acción de las cianobacterias y bacterias del género *Rhizobium*, presentes en el suelo y en ambientes acuáticos, que en condiciones anaerobias son capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico transformándolo en amoníaco ( $NH_3$ ). Posteriormente, se produce la oxidación del amoníaco a nitrito ( $NO_2^-$ ) por la acción de un grupo de bacterias del género *Nitrosomona*, a su vez, el nitrito se oxida a nitrato ( $NO_3^-$ ) por las bacterias del género *Nitrobacter*. El nitrato es una fuente asimilable de nitrógeno para plantas, algas, hongos filamentosos y algunas bacterias y levaduras (Lin et al., 1997). De manera, que en esta forma el nitrógeno es asimilado e incorporado en el metabolismo de los organismos, hasta la descomposición de estos liberando el nitrógeno en forma de amoníaco, quedando disponible para los procesos de nitrificación y asimilación. El ciclo se cierra al producirse la desnitrificación por algunas bacterias que degradan el nitrato y liberan nitrógeno atmosférico. (Figura 1).



**Figura 1. Diagrama del ciclo del nitrógeno**  
Fuente: (Escudero Urquijo, N. 2015).

En las últimas décadas, la carga de nitrógeno en el medio ambiente ha aumentado por el mayor uso de fertilizantes nitrogenados, la intensificación del cultivo y una mayor carga ganadera (Martínez et al, 2002). El principal problema de la fertilización se deriva el uso masivo de nitratos y otros fertilizantes nitrogenados, que impide su adecuado reciclado y procesamiento en los ciclos biogeoquímicos (Gómez, Reig 2013). La contaminación por nitrógeno se produce como consecuencia del arrastre del nitrógeno por lixiviado y escorrentía, que pasa a los acuíferos y a las corrientes superficiales (Martínez et al, 2002). Es por ello, que el estudio de la asimilación del nitrógeno por los seres vivos y en especial del nitrato, cobra vital importancia para intentar contrarrestar los efectos adversos mencionados sobre el medio ambiente. (Rodríguez, 2012).

## 1.2 Asimilación de nitrato en Levaduras

Las levaduras son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de nitrógeno. Sin embargo, el uso de nitrato y nitrito está restringido a relativamente pocas especies de diferentes géneros (Tabla 1) (Siverio, 2002). Sin embargo, las levaduras modelo *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* no presentan esta capacidad (Siverio, 2005). La levadura *Hansenula polymorpha* asimila nitrato y nitrito y ha sido intensamente usada por nuestro grupo para estudiar diferentes aspectos de la asimilación de nitrato en levaduras. El genoma de esta levadura ha sido secuenciado y presenta un desarrollo razonable de las técnicas implicadas en la manipulación genética (Siverio, 2002).

<i>Bensingtonia</i>	<i>Bullera</i> <sup>a</sup>	<i>Candida</i>	<i>Citeromyces</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Chionosphaera</i>	<i>Debaryomyces</i> <sup>a</sup>
<i>Dekkera</i>	<i>Fellomyces</i>	<i>Fibulobasidium</i> <sup>a</sup>	<i>Filobasidium</i>
<i>Hansenula</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Hormoascus</i>	<i>Leucosporidium</i>
<i>Mrakia</i>	<i>Pachysolen</i>	<i>Pichia</i>	<i>Rhodospordium</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Saitoella</i>	<i>Sporidiobolus</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Trichosporon</i> <sup>a</sup>	<i>Wickerhamiella</i>	<i>Willopsis</i>	

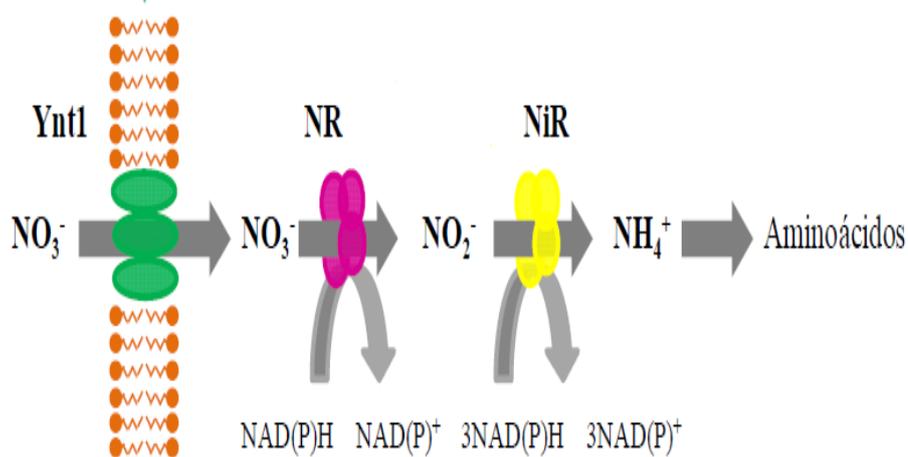
**Tabla 1. Género de levaduras que utilizan nitrato y nitrito**

Aparecen con superíndice las levaduras que utilizan nitrito pero no nitrato. Fuente: (Siverio, 2002).

Por otro lado, nuestro grupo posee una amplia colección de mutantes implicados en esta vía de asimilación. Además, esta levadura es metanolotrófica, termotolerante y ha sido el modelo de estudio por excelencia en la investigación sobre la función y homeostasis de los peroxisomas (Van der Klei, et al., 1995).

### 1.3 Asimilación de nitrato en *H. polymorpha*

La asimilación de nitratos en *H. polymorpha* sigue la misma vía descrita para las plantas y los hongos filamentosos. (Siverio, 2002). El transporte de nitrato se encuentra acoplado al transporte, en sentido contrario, de  $H^+$  por una ATPasa que mantiene el gradiente electroquímico a través de la membrana (Castillo, 2005). Después del transporte a las células, el nitrato se convierte en amonio por dos reducciones sucesivas catalizadas respectivamente por nitrato y nitritos reductasa (Figura 2) (Siverio, 2002). El amonio generado es finalmente incorporado a los esqueletos carbonados mediante la síntesis de glutamato y glutamina por las vías de la glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa- glutamato sintetasa (Magasanik y Kaiser, 2002).



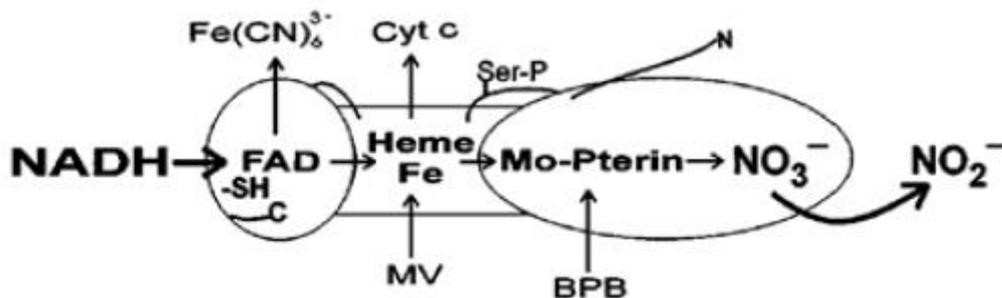
**Figura 2. Asimilación de nitrato en la célula.**

El nitrato entra a la célula a través de un transportador ubicado en la membrana. En el citosol el nitrato es reducido a amonio, por la acción secuencial de la nitrato reductasa y nitrito reductasa con consumo de poder reductor. Fuente: (Rodríguez, 2011)

En *H. polymorpha* los genes que codifican al transportador de nitrato (YNT1), la nitrato reductasa (YNR1), y la nitrito reductasa (YNIR1), se encuentran agrupados en el genoma, junto con dos factores transcripcionales YNA1 y YNA2 (Machín et al, 2003). El gen *YNT1* (Yeast nitrate transporter), codifica un transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad que constituye la principal actividad transportadora de nitrato (Siverio, 2002). Este transportador pertenece a la familia propuesta de NNP (nitrate nitrite porter)

implicada en el transporte de nitratos y nitritos (Forde, 2000). Los miembros de esta familia han sido aislados de organismos procarióticos y eucarióticos. Esta familia pertenece a la Superfamilia de Facilitadores Mayores (MFS), constituida por proteínas con una topología de membrana en la que 12 hélices de membrana conectan los dominios N-terminal citosólico y C-terminal (Pao et al. 1998). El transporte de nitrato de baja afinidad, no relacionado con Ynt1, se ha observado en mutantes que carecen de Ynt1. Sin embargo, el gen o genes implicados en este transporte a fecha de hoy, aún, no han sido clonados (Machín *et al*, 2000).

La enzima nitrato reductasa es una apoenzima homodimérica que se encuentra en el citosol, que contiene hierro hemínico, dinucleótido de flavina y adenina (FAD) en el extremo carboxilo, y el cofactor molibdeno (CoMo) en el extremo amino terminal (Figura 3) (Castillo, 2005). La enzima de la levadura *H. polymorpha* como la mayoría de levaduras nitrato reductasas estudiadas es capaz de utilizar NADH y NADPH como donantes de electrones (Hipkins, 1989).



**Figura 3. Estructura de la enzima nitrato reductasa (NR)**

El NADPH se une en el dominio del FAD, al que transfiere los electrones. La flavina los cede al hierro hemínico del citocromo B<sub>557</sub>, y este al CoMo que los transfiere al NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Fuente: (Campbell, 1999).

#### 1.4 Regulación de la asimilación nitrato en *H. polymorpha*.

Aunque el nitrato es una de las fuentes de nitrógeno más abundantes en la naturaleza, la mayoría de los organismos utilizan más fácilmente el amonio, ya que, el nitrato debe ser reducido a amonio, y este proceso presenta un elevado costo energético, ya que, ocho electrones están involucrados (Siverio, 2002). Para disminuir el coste energético, *H. polymorpha* restringe el uso de nitrato a aquellos ambientes que no contienen fuentes

de nitrógeno reducidas "preferidas" tales como amonio, asparagina o glutamina (Navarro et al, 2006). Este mecanismo, denominado represión catabólica del nitrógeno, permite a la célula regular la captación de nitratos de acuerdo con la disponibilidad de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables. (Navarro et al, 2006). De tal manera, que la transcripción de los genes de la ruta de asimilación de nitrato responde a dos señales esenciales, la primera, la ausencia de fuentes preferidas de nitrógeno (señal de desrepresión) y la segunda la presencia de nitrato (señal de inducción). La primera de las señales es de carácter general, la segunda señal es específica, ya que sólo los genes responsables de la asimilación de nitrato responden a la inducción generada por la presencia de nitrato en el medio (Rodríguez, 2011).

Además, , nuestro grupo ha mostrado que la presencia de fuentes de nitrógeno reducidas provoca la degradación del transportador de Ynt1, mediante la ubiquitinación de los residuos de lisina del transportador, desencadenando la internalización de este en una vacuola y su posterior degradación (Navarro et al, 2006).

### **1.5 La proteína Bmh1 (14-3-3)**

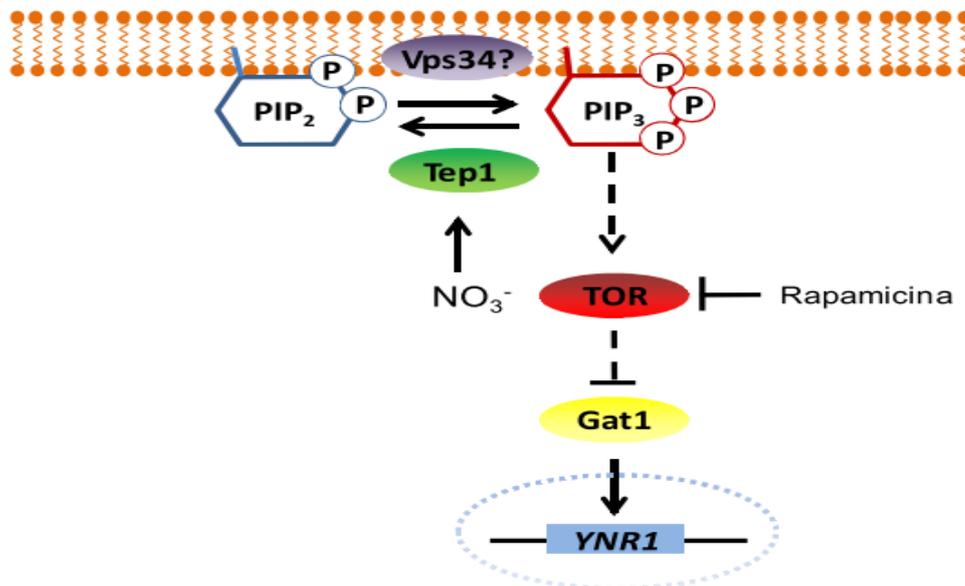
Las 14-3-3 son proteínas diméricas altamente conservadas, presentes exclusivamente en eucariotas. El término "14-3-3" se debe al patrón de migración particular que tienen estas proteínas en una cromatografía bidimensional en DEAE-celulosa y posterior electroforesis en gel de almidón (Comparot et al., 2003).

Esta familia de proteínas se ha visto implicada en múltiples y diversos procesos celulares, tales como, la regulación de la protein kinasa C (PKC), exocitosis (Dubois et al., 1997), la progresión del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA, la apoptosis, el tráfico de proteínas, la transducción de señales, el metabolismo y regulación transcripcional de la expresión génica (Gardino et al., 2006), la adhesión celular (Mhawech, 2005) o en respuestas al estrés (Fiorillo et al., 2014). En plantas se ha descrito el papel regulador de las proteínas 14-3-3 sobre la ruta de asimilación de nitrógeno, modulando la actividad de enzimas claves, como la nitrato reductasa. Esta enzima presenta un control mediante fosforilación, permitiendo la unión de la proteína 14-3-3, causando un cambio conformacional que con lleva a la inactivación de la enzima (Comparot et al, 2003).

En levaduras estas proteínas están altamente conservadas tanto a nivel estructural como a nivel funcional. Es por ello, que las levaduras ofrecen un buen modelo experimental para el estudio de las proteínas 14-3-3.

### 1.6 La proteína Tep1

En nuestro laboratorio, se realizaron un rastreo masivo de genes implicados en la vía de asimilación de nitrato en la levadura *H. polymorpha*. uno de los genes encontrados fue TEP1. La proteína Tep1 es ortóloga de PTEN en humanos, con el cual, presenta un 35% de similitud. Además, presenta actividad fosfatasa en lípidos, regulando los niveles de fosfatidilinositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PI (3,4) P<sub>2</sub>) y fosfatidilinositol 3 fosfato (PI (3) P), manteniéndolos bajos (Rodríguez, 2011). Originariamente, se pensó que existe una correlación entre los niveles de PIP<sub>3</sub> y la expresión de YNR1. De manera que, el nitrato induciría la expresión de TEP1 que desfosforilaría a PIP<sub>3</sub> dando lugar a la acumulación de PI (4,5) P<sub>2</sub>. Los menores niveles de PIP<sub>3</sub> inhibirían la señalización mediada por TOR y, en consecuencia, la desrepresión de los genes de asimilación de nitrato, entre ellos YNR1 (Figura 4) (Rodriguez, 2011).



**Figura 4. Modelo de la relación de Tep1 y la transcripción de YNR1**

El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induce la expresión de Tep1 que desfosforila PIP<sub>3</sub>. La disminución en los niveles de PIP<sub>3</sub> inhibe finalmente a TOR lo que permite la entrada de Gat1 en el núcleo y la inducción de YNR1. La ausencia de Tep1 provoca la acumulación de PIP<sub>3</sub> y, como consecuencia, la activación de TOR que impide la entrada de Gat1 en el núcleo por lo que la expresión de YNR1 disminuye. Fuente: (Rodríguez, 2011).

Sin embargo, resultados recientes y preliminares nos inducen a pensar que Tep1 está implicado en la regulación de los niveles de Ynt1 en la membrana. Así, en la mutación de Tep1, el transportador se acumularía en la membrana, aumentando el flujo de nitrato y la consiguiente acumulación de fuentes reducidas de nitrógeno. Este hecho conduciría a una mayor represión de los genes implicados en la asimilación de nitrato.

## 1.7 Objetivos

El objetivo de este trabajo es un estudio preliminar y parcial, sobre el papel de la proteína Bmh1 (14-3-3) y Tep1 en la regulación del transportador de nitrato Ynt1 en *H. polymorpha*. Para ello, se ha trabajado con cepas con el gen de BMH1 y el gen de TEP1 delecionado, con el fin de comprobar el efecto de esa mutación sobre los siguientes parámetros del metabolismo del nitrato:

- Actividad de la nitrato reductasa
- Nitrito excretado
- Asimilación de nitrato
- Asimilación de nitrito

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Microorganismos utilizados

Para este estudio se emplean diversas cepas de *Hansenula polymorpha* derivada de la cepa NCYC 495 (tabla 2).

Cepa	Genotipo	Origen
NE0000	Wild type (WT).	GMN
BA0002	$\Delta$ bmh1	GMN
NE0084	$\Delta$ tep1	GMN
NE0071	$\Delta$ ynt1	GMN

**Tabla 2. Cepas de *H. polymorpha* empleadas en este trabajo**  
GMN, grupo del metabolismo del nitrógeno, universidad de La Laguna.

### 2.2 Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivos empleados, tanto sólidos como líquidos, se prepararon disolviendo los componentes de cada medio en agua destilada ultrapura, respetando que

el volumen del medio no supere la quinta parte del volumen total del recipiente, con el fin de favorecer una correcta aireación del cultivo. Posteriormente se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Tras la esterilización se tamponaron los medios que lo requerían usando tampón.

### 2.3 Cultivo de levaduras

A partir de colonias aisladas de las cepas utilizadas, se realizaron preinoculos que fueron incubados a 37°C con una agitación de 150 rpm, hasta crecer a saturación (10-12 mg/ml), en un medio líquido indefinido no selectivo de YPD. Para los cultivos, se empleó el medio sintético YGNH (Tabla 3). Tras la inoculación, el cultivo se incubaba a 37°C con agitación a 150 rpm, hasta que alcanzar una densidad óptica (DO) de 1,5. La concentración de los cultivos se determinó midiendo la densidad óptica a 660 nm, utilizando el lector de microplacas (biotek Synergy HT) y el programa Gen5.

YPD	YGNH	YG
Extracto de levadura al 1% (p/v)	Yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulfate (YNB) al 0,17% (p/v)	Yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulfate (YNB) al 0,17% (p/v)
Glucosa al 2% (p/v)	Glucosa al 2% (p/v)	Glucosa al 2% (p/v)
Peptona al 2% (p/v)	Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl) 0,5ml	

**Tabla 3. Composición de los medios de cultivo**

Para medir la absorbancia se realizó una dilución del cultivo 1:10, 100µl del cultivo se resuspendieron en 900µl de agua ultrapura, y se tomaron 200µl de la dilución para medir en el lector. Para hallar la concentración celular, multiplicamos la absorbancia obtenida por el factor de dilución, por 2 y por 3,75, debido a la siguiente relación:

$$1U DO_{660} = 3,75 \text{ mg de células /ml (peso fresco)}$$

Una vez obtenida la densidad celular de los cultivos se toma un volumen (ml) de cada uno de ellos según la cantidad de células que necesitamos para los diferentes ensayos.

Las células fueron recogidas por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en medio YG, a 10 mg de células/ml. Posteriormente, se incubó los medios de YG a 37°C con una agitación de 150 rpm. De esta manera, sometemos a las células a un entorno carente de nitrógeno para agotar las reservas de compuestos nitrogenados reducidos y evitar la represión catabólica por nitrógeno. Posteriormente se indujo el transporte de nitrato mediante la adición de este al medio. A partir, de este momento el procedimiento sufre variaciones según los requerimientos del experimento, por lo que describiré los pasos posteriores en su sección correspondiente.

## **2.4 Determinación de la actividad específica de la Nitrato reductasa (NR)**

El objetivo de este ensayo es determinar los niveles de actividad NR y su evolución en el tiempo en respuesta a diferentes concentraciones de nitrato. Este parámetro lo vamos a usar como medida indirecta del transporte/transportador de nitrato.

### **2.4.1 Obtención de células**

En este ensayo se incubó los cultivos en YG durante 30 minutos, posteriormente, se añadió  $\text{KNO}_3$  a una concentración determinada para inducir la vía de asimilación de nitrato. En este estudio se usaron concentraciones de  $\text{KNO}_3$ : 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

Tras la adición de  $\text{KNO}_3$ , se tomaron 5ml de cultivo cada 30 minutos durante 2,5 horas, tomando duplicados por cada punto. Cada muestra se resuspendió en 5ml de agua fría para parar el metabolismo celular. Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 3500 rpm. posteriormente, tras descartar el sobrenadante, las células se lavaron en 10ml de agua fría. Finalmente, las se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 3500 rpm y se congelaron a -20°C hasta su posterior uso.

### **2.4.2 Obtención de extractos libres de células**

En el proceso de obtención de los extractos crudos las células y los extractos se mantuvieron en hielo para evitar la desnaturalización de las enzimas y la actividad de las proteasas.

En primer lugar, se disolvió una pastilla de inhibidores de proteasas (Complete tablets, Mini EDTA-free, EASY pack, Roche) en 10 ml de tampón de extracción (Tabla 4). Luego, las células se resuspendieron en 500µl de esta disolución. Posteriormente, las

células se traspararon a tubos eppendorf de 1,5 ml de capacidad. La rotura celular se lleva a cabo mediante una homogenización mecánica, añadiendo 1gr de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y agitando los tubos en un homogeneizador FastPrep24 a 6 m/s durante 20 segundos.

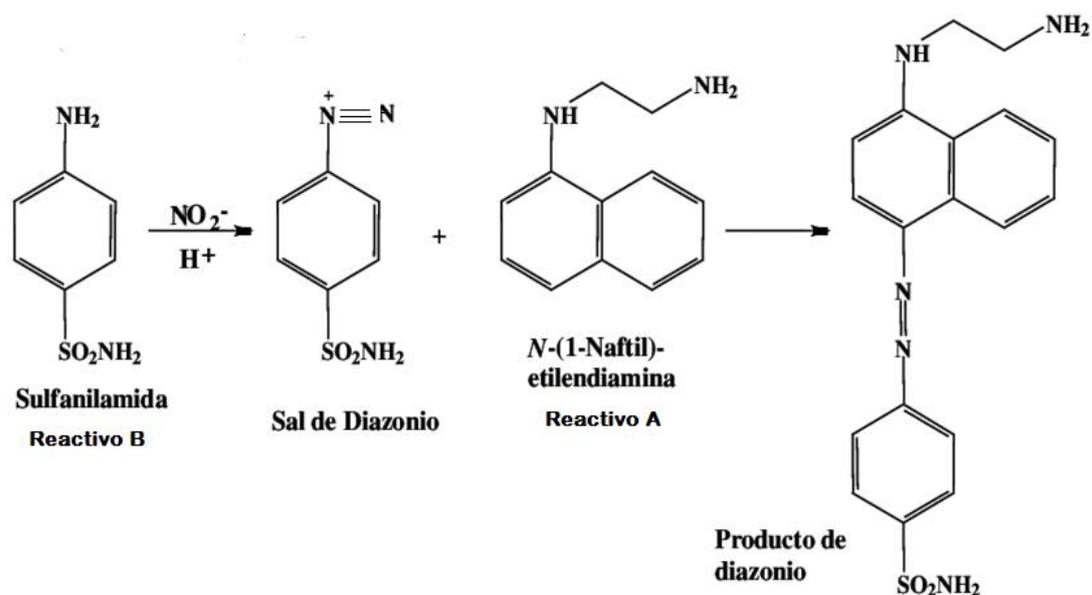
Tras la rotura, se procedió a eliminar las bolas de vidrio mediante centrifugación. Para ello, con una aguja estéril se rompió la base del tubo eppendorf y se colocó sobre otro tubo. Ambos se centrifugaron a 3.200 rpm durante 1min, de tal manera, que el contenido celular del primer tubo se transfiere al otro sin la presencia de las bolas de vidrio. Posteriormente, se somete al extracto a una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, para aislar la fracción soluble separándola de otros componentes celulares. Finalmente, la fracción soluble se trasfiere a un nuevo tubo eppendorf y se realiza inmediatamente la determinación de la actividad NR.

<b>Tampón de extracción</b>
Fosfato potásico 100mM
EDTA 1mM
FAD 0,04 mM

**Tabla 4. Composición del tampón de extracción**

### **2.4.3 Determinación de la actividad nitrato reductasa**

Como se ha comentado anteriormente, la nitrato reductasa es una enzima que cataliza la reducción del nitrato a nitrito. Para determinar la actividad de esta enzima es necesario medir la cantidad de nitrito producido, ya que, este ion es fácil de detectar por métodos colorimétricos a diferencia del nitrato. La determinación de nitrito se realiza mediante el método de Griess (Figura 5), en el cual, se emplea el reactivo B que contiene un 1% de sulfamilamida en 3 N de HCl, y el reactivo A que contiene N-(naphthyl) ethylenediamine al 0,02%. En medio ácido, la sulfamilamida del reactivo B reacciona con el HNO<sub>2</sub> y se transforma cuantitativamente en una sal de diazonio. Esta sal, a su vez, reacciona con el N-(naphthyl) ethylenediamine del reactivo A, formando un producto coloreado que presenta un grupo azo (-N=N), el cual puede ser detectado cuantitativamente a 540nm.



**Figura 5. Demostración del método de Griess**

Fuente: Esquema modificado de (Tenorio et al, 2005).

La actividad de la nitrato reductasa se determinó en un volumen de reacción de 300 µl, realizando duplicados por muestra (tabla 5). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un tubo eppendorf añadiendo el tampón de ensayo que contiene 1 mM de NO<sub>3</sub>, trabajando con una concentración final de NO<sub>3</sub> de 0,6 mM en el ensayo, extracto crudo, y agua ultrapura.

Reacción	Volumen (µl)	Volumen (µl)
Tampón ensayo + 1mM KNO <sub>3</sub>	200	200
Agua	55	25
Extracto	30	60
NADH	15	15

**Tabla 5. Mezcla de reacción NR**

Antes de comenzar la reacción, la mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos para lograr que cada componente de la reacción presente una temperatura uniforme, ya que, la temperatura es un factor importante en la actividad enzimática. Pasado ese tiempo se disparó la reacción añadiendo 15 µl NADH a 3 mM, trabajando con una concentración

de 0,15 mM en el ensayo. Tras añadir el NADH la reacción se incubó 20 minutos. Esta se detiene añadiendo un volumen de reactivo B igual al de la reacción, en este caso 300  $\mu$ l, y posteriormente, se le añadió 300  $\mu$ l del reactivo A para poder cuantificar el NO<sub>2</sub> presente en las muestras. La absorbancia a 540nm se midió utilizando el lector de microplacas (biotek Synergy HT) junto con el programa Gen5.

Paralelamente, se realizó una recta de calibrado con 0,1 mM de nitrito (tabla 6), y se midió la absorbancia a 540nm. Posteriormente, para hallar cuantitativamente la cantidad de NO<sub>2</sub> producido en las muestras, se usó una calculadora fx-82MS y se realizó una interpolación lineal de las absorbancias de las muestras frente a las absorbancias de la recta y su valor de NO<sub>2</sub> correspondiente. El nitrito se expresó en pmoles, según los siguientes cálculos:

$$\text{Ej: } 0,1 \text{ mM NO}_2 \times 10\mu\text{l} \times 10^{-6} = 1 \times 10^{-6} \text{ mmoles de NO}_2$$

$$1 \times 10^{-6} \text{ mmoles de NO}_2 / 1000000 = 1 \text{ pmol NO}_2$$

H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	NO <sub>2</sub> 0,1 mM ( $\mu$ l)	Reactivo B ( $\mu$ l)	Reactivo A ( $\mu$ l)	pmoles NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
300	0	300	300	0
298	2	300	300	0,2
295	5	300	300	0,5
290	10	300	300	1
280	20	300	300	2
260	40	300	300	4
240	60	300	300	6
220	80	300	300	8
200	100	300	300	10

**Tabla 6. Recta de calibrado de nitrito.**

Tras determinar cuantitativamente el NO<sub>2</sub> de las muestras, se realizó los cálculos pertinentes para hallar la actividad específica de la NR presente en las muestras. Para ello, en primer lugar, se calculó la actividad enzimática. Esta se define como la

velocidad a la que el sustrato desaparece o se produce por unidad de tiempo. El sistema Internacional define, 1U (Unidad internacional) = 1 $\mu$ mol sustrato/min. En este trabajo la actividad se expresó en pmoles /min. De tal manera, que su cálculo sería el siguiente:

Ej:

$$\text{pmoles NO}_2 / \text{tiempo reacción (20 minutos)} = \text{pmoles NO}_2 \times \text{min}^{-1}$$

$$\text{pmoles NO}_2 \times \text{min}^{-1} / \text{volumen del extracto (ml)} = \text{pmoles NO}_2 \times \text{min}^{-1} / \text{ml de extracto}$$

Una vez hallado la actividad enzimática se halló el promedio entre los duplicados de cada muestra. La actividad específica se define como la velocidad de una reacción enzimática normalizada con la cantidad de proteínas. Para determinar la actividad específica de la enzima se dividió el promedio de la actividad enzimática de cada muestra entre la cantidad total de proteínas en el ensayo. Posteriormente, los resultados fueron expresados gráficamente.

#### **2.4.4 Determinación de las proteínas totales**

Para hallar la actividad específica de una enzima debemos determinar la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras. En este trabajo la determinación se llevó a cabo utilizando el método de Bradford. Este método consiste en el empleo del colorante hidrofóbico Coomassie Brilliant Blue-250 que en condiciones ácidas presenta su forma protonada. Al entrar en contacto con proteínas e interaccionar con los aminoácidos básicos y cadenas aromáticas, se convierte en su forma desprotonada adquiriendo color azul, fácilmente detectable por colorimetría a 595 nm, existiendo una relación lineal entre la cantidad de proteínas y la intensidad del color azul.

La medición de proteínas totales se realizó en un tubo eppendorf de 1,5 ml de capacidad, al cual se le añadió agua ultrapura, el extracto y, por último, el colorante coomassie brilliant blue- 250 diluido 1:6, en un volumen total de 100 $\mu$ l (Tabla 7). Para este ensayo se suele tomar valores muy pequeños de muestra, por ello, el extracto se diluyó 1:5, para poder tomar volúmenes mayores y minimizar el error cometido con la pipeta. Se realizaron duplicados por muestra.

<b>Muestra (μl)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (μl)</b>	<b>Bradford (μl)</b>
30	70	100
60	40	100

**Tabla 7. Volúmenes empleados para la medición de las proteínas totales**

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una recta de calibrado empleando como proteína patrón la albúmina bovina a 0,1 mg/ml. (Tabla 8).

<b>Albúmina 0,1 mg/ml (μl)</b>	10	20	40	60	80	100
<b>H<sub>2</sub>O (μl)</b>	90	80	60	40	20	0
<b>Bradford (μl)</b>	100	100	100	100	100	100

**Tabla 8. Volúmenes empleados en la recta de albúmina**

La determinación de las proteínas se realizó igual que la del nitrilo mediante interpolación lineal de las absorbancias de las muestras con respecto a las absorbancias de la recta, utilizando la calculadora fx-82MS. Posteriormente, se halló el promedio de los duplicados de cada muestra, el cual, fue el valor que se empleó para el cálculo de la actividad específica.

## **2.5 Determinación del nitrito excretado**

El objetivo de este ensayo es determinar la cantidad de nitrito excretado al medio extracelular durante la inducción de nitrato. Se realiza como medida complementaria, al estudio de la actividad de nitrato reductasa, ya que, esta medida nos aporta información sobre la actividad de la enzima y el consecuente transporte de nitrato a la célula.

### **2.5.1 Obtención de muestras**

Paralelamente, a la toma de muestras para la nitrato reductasa se tomó 100 μl de cultivo cada 30 minutos durante 3 h. Las células fueron eliminadas por centrifugación a 13.200

rpm durante 1 minuto, la fracción soluble carente de células fue guardada a -20°C hasta su uso.

### 2.5.2 Determinación del nitrito excretado

El ensayo consiste en medir la cantidad de nitrito presente en el medio extracelular en un volumen de 300  $\mu$ l. La determinación de nitrito excretado se realiza con el método de Griess. Para ello, en un tubo eppendorf se añadió agua ultrapura, las muestras, y los reactivos B y A, respectivamente, y se midió la absorbancia a 540 nm. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente (Tabla 9).

Muestra ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Reactivo B ( $\mu$ l)	Reactivo A ( $\mu$ l)
90	210	300	300

Tabla 9. Volúmenes empleados en la medición de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> excretado

Una vez medidas las absorbancias, se calcula la cantidad de nitrito presente en las muestras interpolando las absorbancias de las muestras con las absorbancias de una recta de nitrito con valores conocida, como se explicó en la sección anterior, y se representa gráficamente.

## 2.6 Determinación de la tasa de asimilación de nitrito

Como ya se ha comentado con anterioridad, el transportador Ynt1 transporta tanto nitrato como nitrito con alta afinidad, por ello, es interesante llevar a cabo análisis sobre la capacidad asimiladora de nitrito en las diferentes cepas. El objetivo de este ensayo es medir la desaparición de nitrito extracelular del medio, para apreciar el comportamiento que presenta cada cepa en relación, al transporte de nitrito en su interior.

### 2.6.1 Obtención de células

En este ensayo el medio en YG se ha tamponado con 20 mM de Mes-Tris, ya que, en trabajos anteriores de este laboratorio se ha visto que el uso de un tampón mejora considerablemente los resultados. El cultivo de células en YG se incubó a 37°C con agitación a 150 rpm durante 1 hora, posteriormente, se añadió NaNO<sub>2</sub> a 0,5 mM. Se tomaron 500  $\mu$ l de muestra cada 15 minutos durante 3 horas. Las muestras fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de agua ultrapura fría, para parar el metabolismo celular. Las

muestras se centrifugaron a 13.200 rpm durante 1 minuto para eliminar las células del medio extracelular. Finalmente, se tomó el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta su uso.

### 2.6.2 Determinación del transporte de nitrito

La medición de la desaparición de nitrito en el medio extracelular se realiza mediante el método de Griess. Por tanto, en un tubo eppendorf se añadió agua ultrapura, la muestra y los reactivos B y A, respectivamente, y se midió a 540 nm (Tabla 10). El ensayo se realizó a temperatura ambiente.

Muestra (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)	Reactivo B (µl)	Reactivo A (µl)
50	50	100	100

Tabla 10. Volúmenes empleados en la medición del transporte de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Una vez medidas las absorbancias se procedió al cálculo de la velocidad de asimilación de nitrito, para determinar que cepa asimilaba más nitrito a su interior. Para ello, se calculó la pendiente de cada cepa, de la siguiente manera:

Ej:

En primer lugar, se expresó gráficamente las absorbancias obtenidas. Se tomó dos puntos por cada cepa, uno inferior y otro superior, donde las absorbancias representasen una recta y se halló la diferencia entre las absorbancias escogidas. Estas se dividieron entre la diferencia del tiempo de las absorbancias escogidas. Y el resultado se dividió entre la concentración celular del cultivo.

$\Delta y$  = diferencia entre las absorbancias

$\Delta x$  = diferencia entre los tiempos

$(\Delta y / \Delta x)$  = pendiente de la recta = velocidad

$(\Delta y / \Delta x) / \text{mg/ml cultivo}$  = velocidad normalizada

## 2.7 Determinación de la tasa de asimilación de nitrato

El objetivo de este ensayo es medir la desaparición del nitrato extracelular, para comparar el comportamiento de cada cepa en relación, a la asimilación de nitrato.

### 2.7.1 Obtención de células

La obtención de muestras se realizó como para el caso de nitrito solo que en esta ocasión se realizó la inducción mediante la adición de 0,5 mM KNO<sub>3</sub>.

### 2.7.2 Determinación del transporte del nitrato

En este ensayo la medición de la desaparición de nitrato extracelular es indirecta, se utilizó nitrato reductasa (NR) pura procedente de NECI, para transformar el nitrato extracelular a nitrito, que es fácilmente detectable por colorimetría a 540 nm. Para ello, en tubos eppendorff se preparó la reacción en un volumen final de 100 µl. Se empleó agua ultrapura, las muestras, nitrato y un cocktail, que contiene tampón, NADH y NR pura (Tabla 11 y 12).

Cocktail (µl)	Muestras (µl)	H2O (µl)
50	20	30

Tabla 11. Volúmenes empleados para determinar la desaparición de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> extracelular

Cocktail (µl)	Reacciones (x1)	Reacciones (x50)
Tampón (µl)	40	2000
NADH 2 mM (0,16 mM en el ensayo)	8	400
NR pura (µl)	2	100

Tabla 12. Composición del cocktail con volúmenes utilizados para una reacción, y 50 reacciones.

Paralelamente se realizó una recta patrón de nitrato con la que poder interpolar los valores obtenidos en las muestras en esta, y hallar la cantidad de  $\text{NO}_3^-$  presente en las muestras. La recta patrón se realizó siguiendo el mismo modus operandi que con las muestras, se empleó el cocktail, nitrato, y agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 100  $\mu\text{l}$  (tabla 13).

<b>Cocktail (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	50	50	50	50	50	50
<b><math>\text{KNO}_3</math> 0,1 mM (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	0	10	20	30	40	50
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math> (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	50	40	30	20	10	0

**Tabla 13. Volúmenes empleados en la recta patrón de  $\text{NO}_3^-$**

Posteriormente, las muestras y la recta son incubadas a 30°C durante toda la noche. Tras la incubación, tanto a las muestras como a la recta, se les añadió 100  $\mu\text{l}$  de los reactivos de Griess. Y se procedió a medir las absorbancias a 540 nm.

A su vez, se realizó una recta patrón de nitrito, como las especificadas anteriormente, para llevar un control del ensayo. De tal manera, que, si los valores de la recta de nitrato y nitrito se superponen o asemejan, significaría que se ha transformado todo el nitrato a nitrito. En cambio, si se alejaran significaría que la conversión del nitrato no es total.

Además, también se realizó la medición del nitrito excretado en cada muestra, para evitar que ese valor estuviera interfiriendo en el ensayo, y sobrestimar el transporte de cada cepa. Para ello, en un tubo eppendorf se añadió agua ultrapura, las muestras y los reactivos de Griess. Posteriormente, se midió las absorbancias a 540 nm (Tabla 14). Para este experimento se utilizó la recta de nitrito anterior como recta patrón.

<b>Muestra (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b><math>\text{H}_2\text{O}</math> (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Reactivo B (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Reactivo A (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
20	80	100	100

**Tabla 14. Volúmenes empleados para la medición del  $\text{NO}_2^-$  excretado**

En este ensayo, los cálculos se realizaron interpolando las absorbancias obtenidas en la recta patrón de nitrato mediante el uso de una calculadora fx-82MS, para calcular la cantidad de  $\text{NO}_2^-$  presente en cada muestra, luego se les restó la cantidad de nitrito excretado, también hallado por interpolación de las absorbancias de las muestras con la recta de nitrito, y se representó gráficamente.

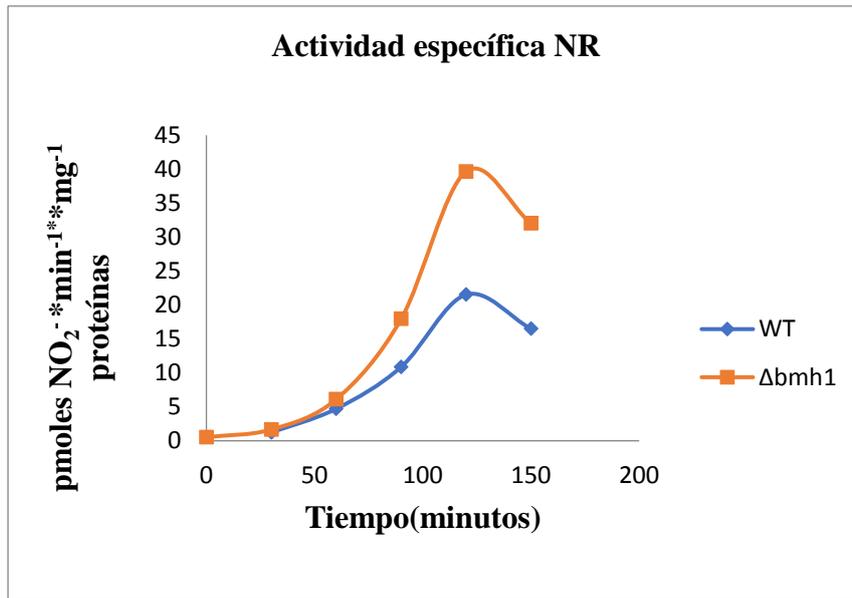
### **3 RESULTADOS Y DISCUSION**

Los resultados presentados en este trabajo corresponden a un experimento independiente representativo de cada análisis.

#### **3.1 Actividad de la nitrato reductasa y excreción de nitrito en las cepas $\Delta\text{bmh1}$ y WT a diferentes concentraciones de nitrato.**

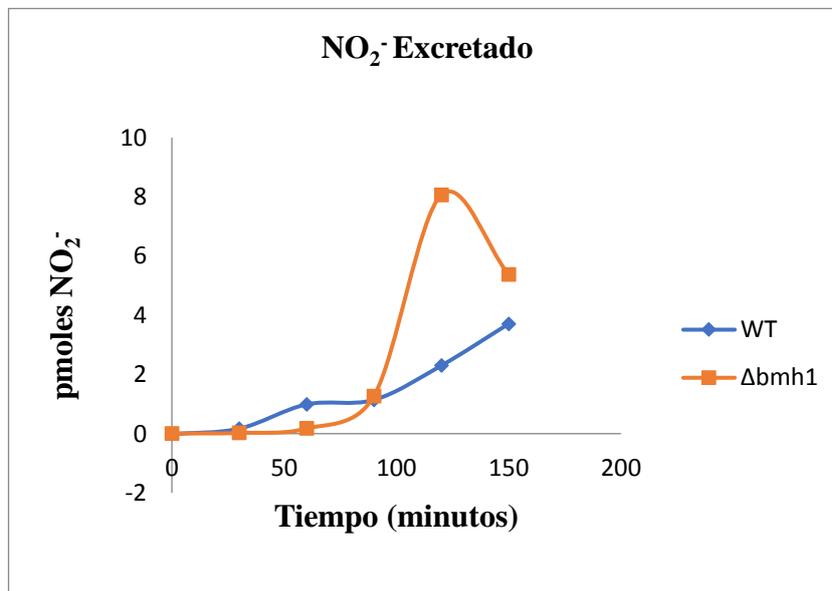
El estudio sobre la actividad NR y la excreción de nitrito se llevó a cabo en las cepas WT y  $\Delta\text{bmh1}$ . Se usó nitrato a 1, 2, 5 y 10 mM para inducir la vía de asimilación del nitrato. En general, los resultados preliminares obtenidos indican que los niveles de actividad de la nitrato reductasa en la cepa  $\Delta\text{bmh1}$  son mayores que en WT. Los datos también parecen indicar que la actividad NR disminuye con el aumento de la concentración de nitrato. Consistente con estos resultados se observa un aumento de la excreción de nitrito en la cepa mutante. Los resultados muestran que en condiciones con altas concentraciones de nitrato la excreción de nitrito en el WT y  $\Delta\text{bmh1}$  se asemejan.

Estos resultados son consistentes con nuestra hipótesis inicial de que los niveles de Ynt1 son inversamente proporcionales a la actividad NR. De manera, que, si una cepa presenta una elevada tasa asimiladora de nitrato, la actividad de la nitrato reductasa se ve reducida debido a la represión de esta por una acumulación de las especies reducidas de nitrógeno. Para contrastar definitivamente esta hipótesis es necesario determinar los niveles de Ynt1 en las mismas condiciones experimentales a las usadas para determinar la actividad NR. A parte, sería aconsejable repetir todos los experimentos.



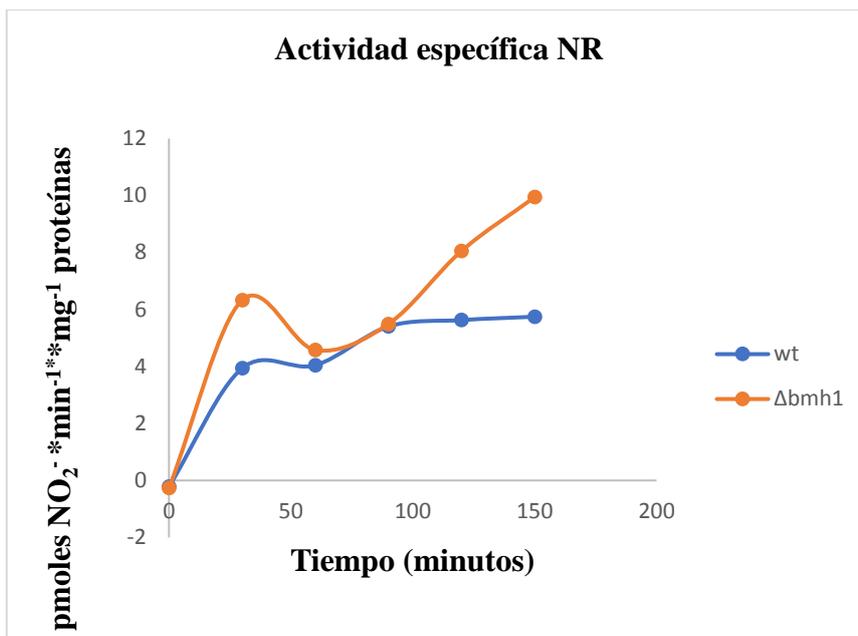
**Figura 6. Actividad NR en células incubadas a 1 mM KNO<sub>3</sub>.**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y posteriormente se incubaron en KNO<sub>3</sub> 1 mM durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min y se determinó la actividad NR.



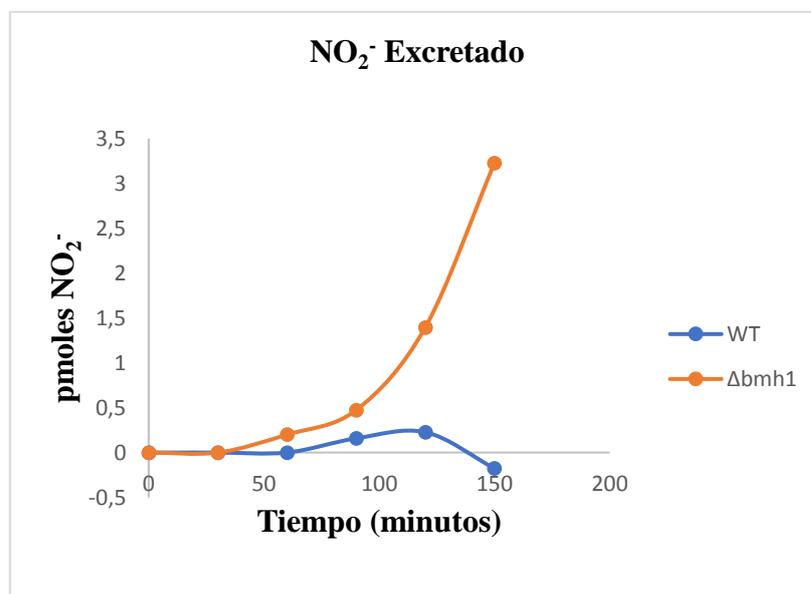
**Figura 7. Excreción de nitrito al medio en células incubadas en 1mM KNO<sub>3</sub>.**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y se incubaron en 1 mM KNO<sub>3</sub> durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min, y se determinó la concentración de nitrito extracelular por método de Griess.



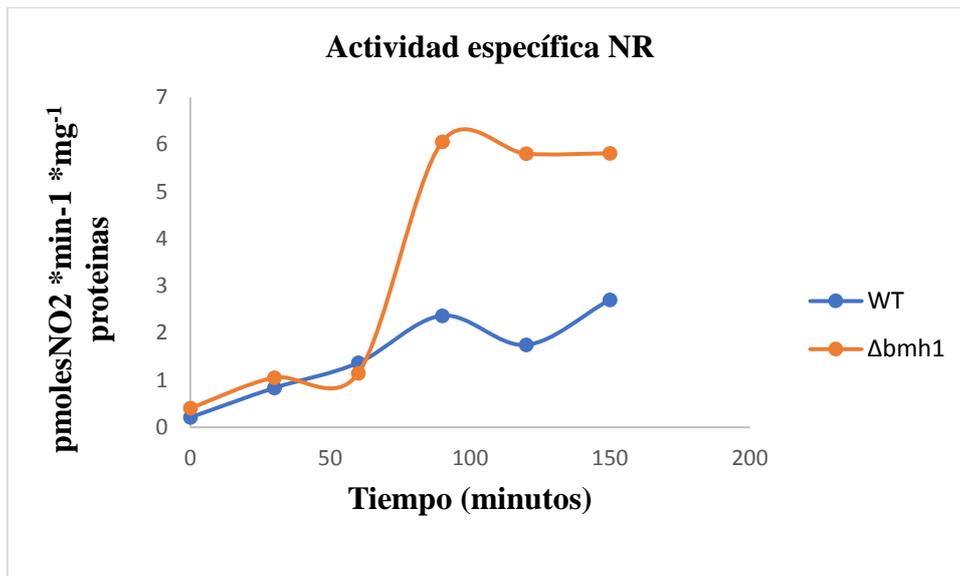
**Figura 8. Actividad NR a inducción 2mM KNO<sub>3</sub>**

Las células crecieron en medio YGNH hasta  $DO_{660} = 1,5$ . Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y posteriormente se incubaron en KNO<sub>3</sub> 2 mM durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min y se determinó la actividad NR.



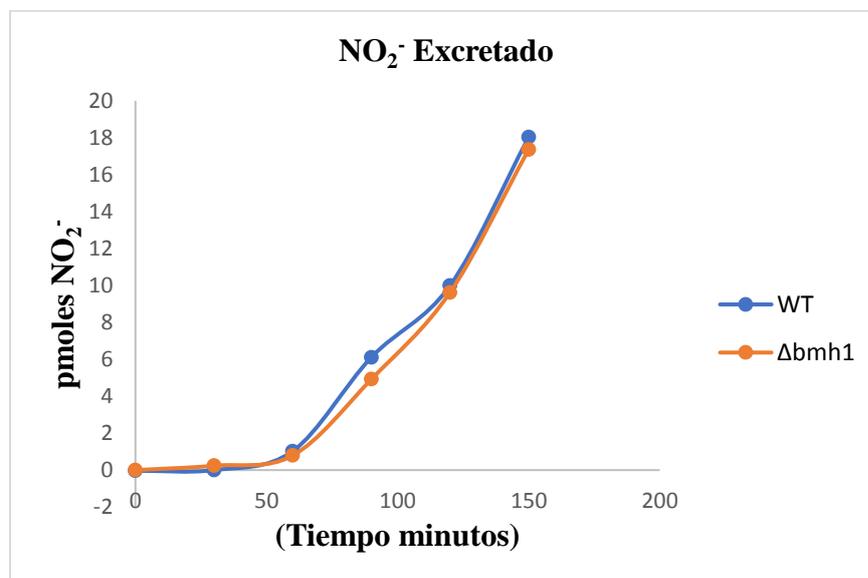
**Figura 9. Excreción de nitrito al medio en células incubadas en 2 mM de KNO<sub>3</sub>.**

Las células crecieron en medio YGNH hasta  $DO_{660} = 1,5$ . Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y se incubaron 2 mM KNO<sub>3</sub> durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min, y se determinó el nitrito excretado por el método de Griess.



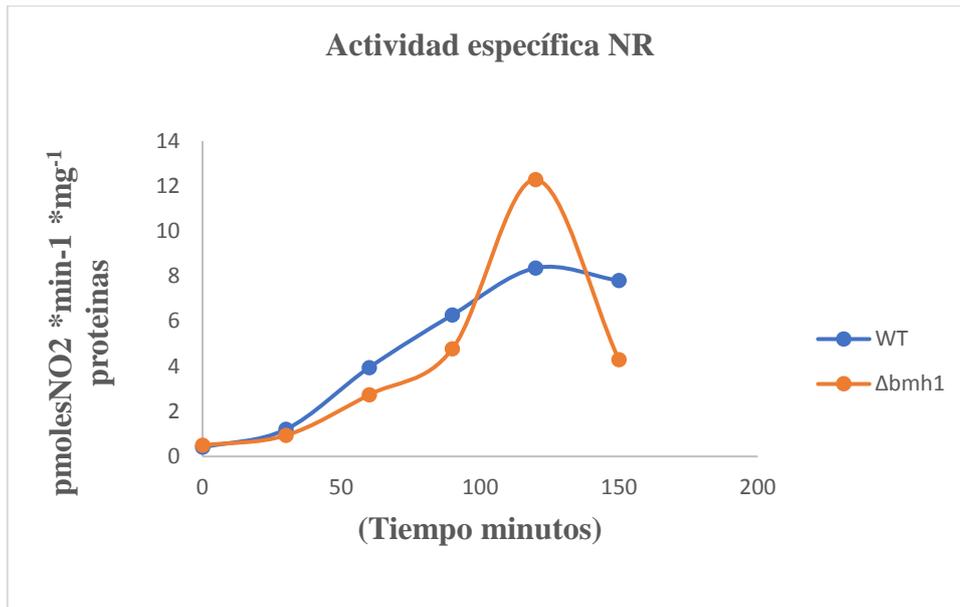
**Figura 10. Actividad NR en células incubadas en 5mM KNO<sub>3</sub>.**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y se incubaron en 5 mM KNO<sub>3</sub> durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min, y se determinó la actividad NR.



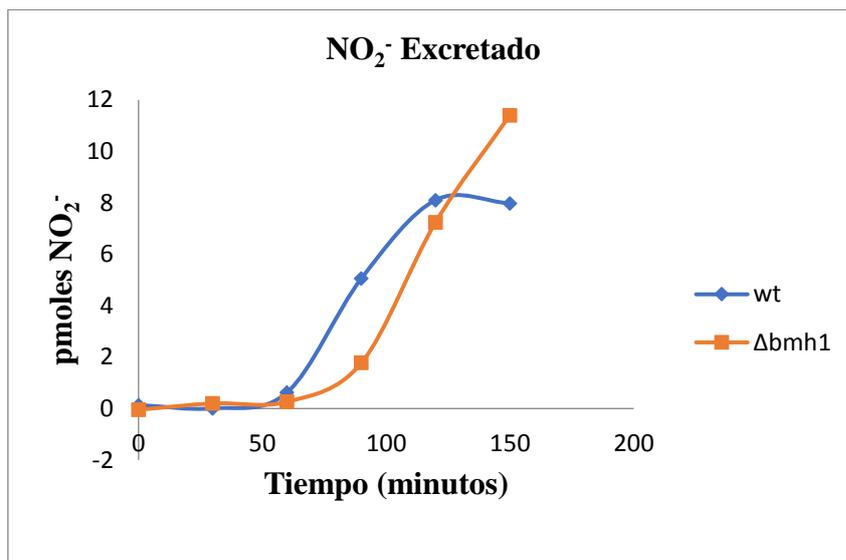
**Figura 11. Excreción de nitrito al medio en células incubadas en 5 mM KNO<sub>3</sub>.**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y se incubaron en 5 mM KNO<sub>3</sub> durante 2,5 horas. Se tomaron muestra cada 30 min, y se determinó la concentración de nitrito extracelular por método de Griess.



**Figura 12. actividad específica de la NR a 10mM KNO<sub>3</sub>**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y se incubaron 10mM KNO<sub>3</sub> durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min, y se determinó la actividad NR.



**Figura 13. Excreción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a 10mM KNO<sub>3</sub>**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 30 minutos y se incubaron 10 mM KNO<sub>3</sub> durante 2,5 horas. Se tomaron muestras cada 30 min, y se determinó la concentración de nitrito extracelular por método de Griess.

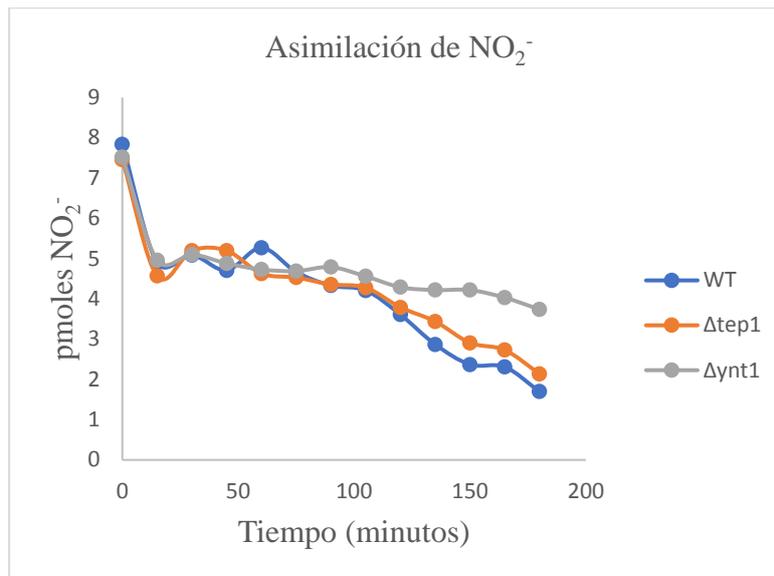
### 3.2 Asimilación de nitrito

El estudio de la asimilación de nitrito se llevó a cabo en las cepas  $\Delta tep1$ ,  $\Delta ynt1$  y WT. La inducción de la vía asimiladora de nitrito se realizó a 0,5 mM de  $KNO_3$  en un medio YG tamponado con 20 mM de MES-Tris a pH 5,5 Y pH 6,5. En un principio, pretendíamos determinar la asimilación de nitrato y nitrito en la cepa  $\Delta bmh1$ . Sin embargo, por causas organizativas determinamos en primer lugar la asimilación de nitrato y nitrito en la cepa  $\Delta tep1$ . Lamentablemente, por razones de tiempo no hemos podido presentar aquí los resultados sobre la cepa  $\Delta bmh1$ .

Los resultados obtenidos a pH 6,5 (Figura 14) muestran que el mutante  $\Delta tep1$  presenta la mayor capacidad de asimilación de nitrito. Los cálculos de la pendiente (Tabla 16) arrojan valores de alrededor del doble de asimilación en  $\Delta tep1$  que la cepa silvestre. En cambio, la cepa  $\Delta ynt1$ , que carece del transportador de nitrato, presenta valores muy bajos de asimilación de nitrito. Los ensayos a pH 5,5 (Figura 15) muestran resultados similares. Sin embargo, la cepa  $\Delta ynt1$  presenta una alta tasa de asimilación de nitrito, a niveles similares de la cepa  $\Delta tep1$  (Tabla 18).

Hace algunos años se observó en nuestro laboratorio (Machín, F., et al 2000) que la cepa  $\Delta ynt1$  era capaz de transportar nitrito a pH alrededor de 5. Esto sería debido a un transporte alternativo a Ynt1 o a la protonación del nitrito para dar ácido nitroso que difundiría al interior celular. Por tanto, los resultados sobre  $\Delta ynt1$  a pH= 5,5 en este trabajo, deberían ser tomados con cautela.

Según estos resultados cabría esperar que en la cepa  $\Delta tep1$  presentase una actividad nitrato reductasa menor que la de WT (Guillén, 2006) y de acuerdo con nuestra hipótesis debería presentar menores niveles de Ynt1.



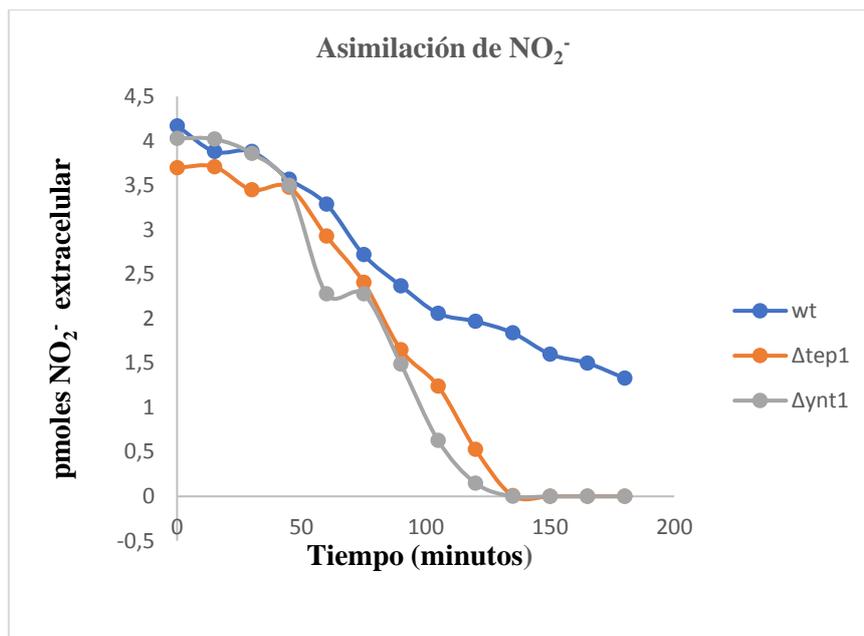
**Figura 14. Asimilación de nitrito en el medio en células incubadas en 0,5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a pH=6,5.**  
 Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 1 hora y se incubaron en 0,5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> durante 3 horas. Se tomaron muestras cada 15 min, se y se determinó la desaparición de nitrito en el medio por método de Griess.

cepas	WT	Δtep1	Δynt1
mg células/ml	19,0	9,4	23,3

**Tabla 15. Concentración celular de los cultivos empleados para el ensayo de la asimilación de nitrito en 0,5 mM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a pH=6,5.**

Cepa	Velocidad ((Δy/Δx))/DO <sub>660</sub> Unidades arbitrarias
WT	1,55
Δtep1	2,63
Δynt1	0,76

**Tabla 16. Velocidad de asimilación de nitrito en células incubadas en 0,5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y pH 6,5.**



**Figura 15. Asimilación de nitrito en células incubadas a 0,5 mM NO a pH= 5,5**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO<sub>660</sub>= 1,5. Fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG durante 1 hora y se incubaron en 0,5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> durante 3 horas. Se tomaron muestras cada 15 min, y se determinó la desaparición de nitrito extracelular por método de Griess.

cepas	WT	Δtep1	Δynt1
mg células/ml	17,5	22,1	25,4

**Tabla 17. Concentración celular de los cultivos empleados para el ensayo de la asimilación de nitrito en 0,5 mM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a pH=5,5.**

Cepa	Velocidad ((Δy/Δx)/DO <sub>660</sub> ) Unidades arbitrarias
WT	2,9
Δtep1	4,2
Δynt1	4,8

**Tabla 18. Velocidad de asimilación de nitrito en células incubadas en 0,5 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y pH= 5,5.**

### 3.3 Asimilación de nitrato

El estudio de la asimilación de nitrato se llevó a cabo con las cepas Δtep1, Δbmh1 y WT. La inducción de la vía asimiladora de nitrato se realizó con 0,5 mM de KNO<sub>3</sub> en medio YG tamponado con 20 mM de MES-Tris a pH= 5,5. Previamente, se realizó la

optimización de la metodología empleada para determinar el nitrato, usando la enzima NR de *H. polymorpha* producida y comercializada por la empresa NECI (USA).

El ensayo se basa en medir la desaparición de nitrato del medio. El nitrato se determinó transformándolo en nitrito mediante NR pura. El nitrito se midió mediante el método de Griess. En un principio, se realizó la recta de nitrato con 2  $\mu$ l de enzima, y la reacción se incubó a 37°C durante 2 horas. Al comparar los valores de la recta de nitrato con la del control de nitrito, se observó una gran diferencia. La recta nitrato presentaba valores ínfimos de nitrato. Esto nos llevó a pensar que la cantidad de enzima empleada era muy pequeña, o que el tiempo de incubación no era suficiente, o que la concentración de nitrato empleada era muy pequeña. Además, las especificaciones de la empresa de comercialización de la enzima indicaban trabajar a una temperatura de 30°C, con lo cual, realizamos controles de la recta nitrato incubando durante toda la noche a 30°C, subiendo en unos casos la concentración de nitrato a 1 mM, y en otros la de enzima. De manera que observamos (Figura 16), una superposición casi perfecta entre las rectas de nitrato y nitrito.

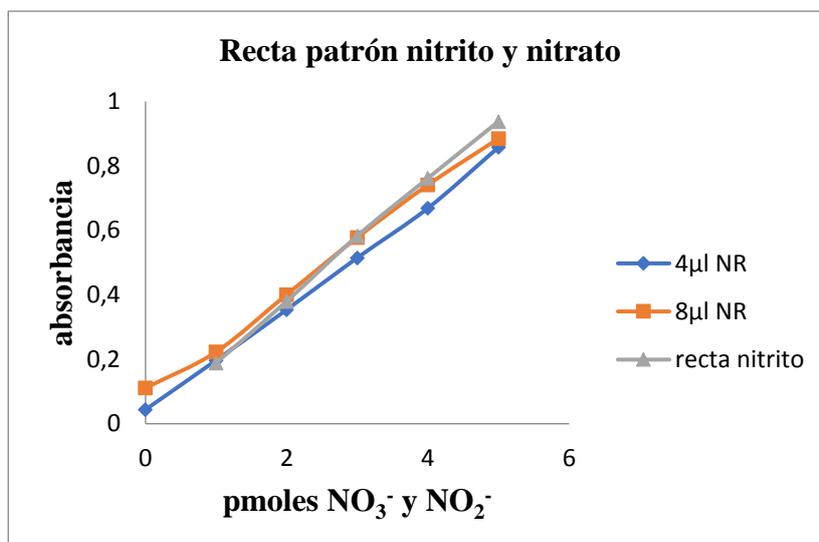
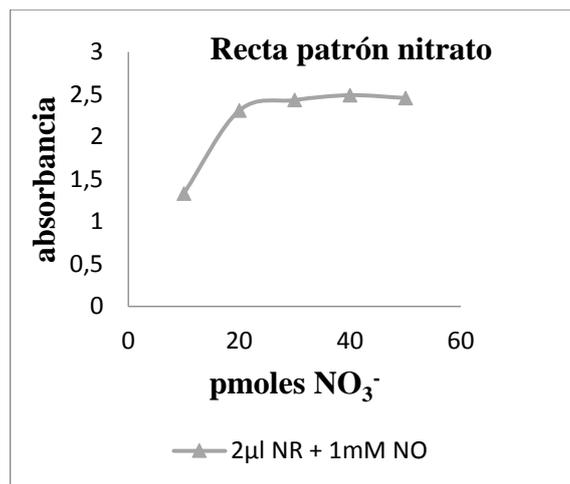


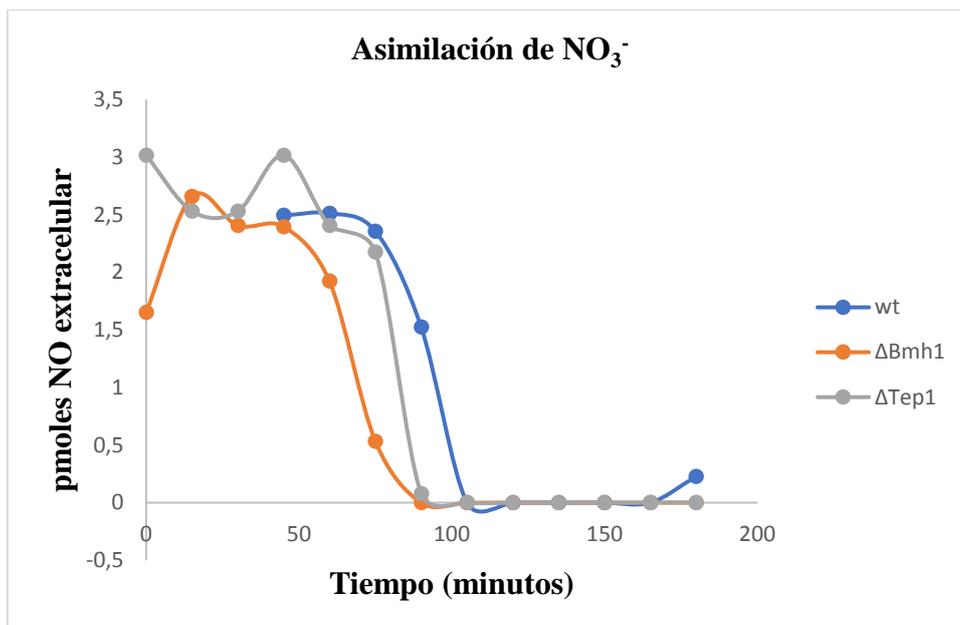
Figura 16. Representación de las rectas patrón de nitrato y nitrito



**Figura. 17 Recta nitrato**

Los resultados de los controles (Figura 16 y 17) sugieren que la concentración de enzima y sustrato originales no son un problema a la hora de realizar el ensayo. Por ello, probablemente el principal inconveniente era que la reacción necesitaba un mayor tiempo de incubación. A partir, de estos resultados en este estudio se empleó 2 µl de enzima, y se incubó la reacción a 30°C durante toda la noche.

En los datos del primer experimento de la tasa de asimilación de nitrato (Figura 18) se observa durante los primeros 60 min una fase donde el nitrato desaparece lentamente, seguida de una fase de rápida desaparición de nitrato de aproximadamente 60 minutos. Si observamos la fase lineal de la desaparición de nitrato se concluye que la tasa de asimilación es similar en todas las cepas, quizá algo mayor en  $\Delta$ tep1. Sin embargo, estos datos deben tomarse con cautela, debido a que, la concentración de células resultó muy alta obteniéndose pendientes demasiado pronunciadas. Decidimos, por tanto, realizar el mismo experimento, pero usando una concentración inicial de células de 5mg/ml. En este experimento (figura 19 y tabla 19) se muestran pendientes menores con respecto al experimento anterior, sin embargo, la gran dispersión en los resultados no permite sacar conclusiones, excepto que para este tipo de experimentos las concentraciones de células empleadas deben ser alrededor de 5 mg/ml. Se deben hacer más experimentos para obtener conclusiones solidas sobre la tasa de asimilación de nitrato en estas cepas.

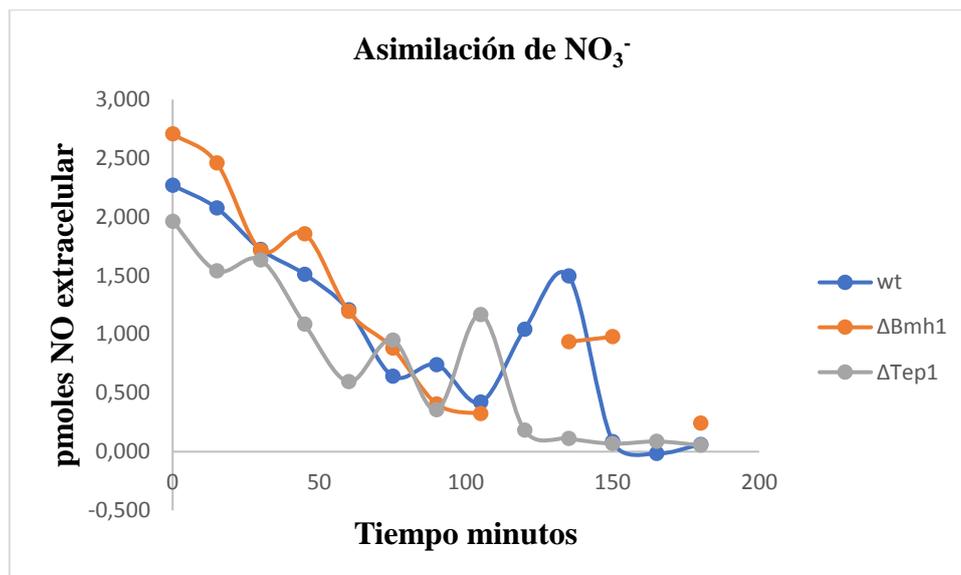


**Figura 18. Asimilación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a 0,5 mM de KNO<sub>3</sub>, en medio tamponado con 20 mM de MES-Tris a pH 5,5**

Las células crecieron en medio YGNH hasta DO660= 1,5. Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG tamponado con 20 mM de MES-Tris a pH 5,5, durante 1 hora y se indujeron 0,5 mM KNO<sub>3</sub> durante 3 horas. Se tomaron alícuotas cada 15 min y se determinó la desaparición de nitrato extracelular.

cepas	WT	Δtep1	Δynt1
mg células/ml	19,4	19,8	19,6

**Tabla 19. Concentración celular de los cultivos empleados para la asimilación de nitrato en 0,5 mM KNO<sub>3</sub> a pH= 5,5**



**Figura 18.** Asimilación de  $\text{NO}_3^-$  a 0,5 mM de  $\text{KNO}_3$ , en medio tamponado con 20 mM de MES-Tris a pH 5,5. Concentración celular inicial de 5 mg células/ml

Las células crecieron en medio YGNH hasta  $\text{DO}_{660} = 1,5$ . Se resuspendieron a 10 mg/ml, fueron sometidas a ayuno de nitrógeno en medio YG tamponado con 20 mM de MES-Tris a pH 5,5, durante 1 hora y se indujeron 0,5 mM  $\text{KNO}_3$  durante 3 horas. Se tomaron alícuotas cada 15 min, y se determinó la desaparición de nitrato extracelular. El ensayo se realizó con 5 mg de células/ml.

cepas	WT	$\Delta\text{tep1}$	$\Delta\text{ynt1}$
mg células/ml	12,4	10,7	12,9

**Ilustración 11.** Concentración celular de los cultivos empleados para la asimilación de nitrato en 0,5 mM de  $\text{KNO}_3$  a pH=5,5. Disminuyendo la concentración de células inicial a 5 mg células/ml

Cepa	Velocidad $((\Delta y/\Delta x)/ \text{DO}_{660})$ Unidades arbitrarias
WT	2,8
$\Delta\text{tep1}$	4,0
$\Delta\text{bmh1}$	6,4

**Tabla 21.** Velocidad de asimilación de  $\text{NO}_3^-$  muestras reducidas a 0,5 mg células/ml.

En este experimento se calculó las velocidades porque las densidades de los cultivos son distintas, a diferencia, del anterior donde eran similares. Así, normalizamos los resultados con la concentración de cada cultivo para hacernos una idea más acertada del comportamiento de las cepas.

## 4 CONCLUSIONES

He aprendido a preparar medios de cultivos, cultivar levaduras, determinar la actividad NR, concentración de proteínas, nitrito y nitrato. También a determinar la tasa de asimilación de nitrito y la excreción de nitrito. Y he dado mis primeros pasos en la determinación de la tasa de asimilación de nitrato.

Los elevados niveles de actividad NR mostrados la cepa  $\Delta$ bmh1 sugieren que esta proteína podría estar implicada en la regulación de los niveles de Ynt1. Por lo que, esperaríamos que esta cepa presente menores niveles de Ynt1.

La tasa de asimilación de nitrito sugiere que  $\Delta$ tep1 presenta mayores niveles de Ynt1 que el WT. Por ello, la proteína Tep1 podría participar en la regulación de Ynt1.

## 5 REFERENCIAS

Campbell, W. H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual review of plant biology*, 50(1), 277-303.

Castillo, F. Ciclos biogeoquímicos III, Biotecnología ambiental. 2005. Editorial Tebar. 169-171. Madrid, España.

Comparot, S., Lingiah, G., and Martin, T. 2002. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 54(382):595-604.

Fiorillo, A., di Marino, D., Bertuccini, L., Via, A., Pozio, E., Camerini, S., and Lalle, M. 2014. The Crystal Structure of *Giardia duodenalis* 14-3-3 in the Apo Form: When Protein Post-Translational Modifications Make the Difference. *PloS One*, 9(3): e92902.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092902>

Forde, B. G. 2000. Nitrate transporters in plants: Structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1465:219-235.

Dubois, T., Howell, S., Amess, B., Kerai, P., Learmonth, M., Madrazo, J., and Aitken, A. 1997. Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3 protein: Role in coordinating signal transduction pathways. *Journal of Protein Chemistry*, 16(5): 513-522.

Escudero, N., Regulación de los transportadores Ynt1 y Hak1 en la levadura *Hansenula polymorpha*. Papel de las arrestinas. 2015, Tesis doctoral, Universidad de La Laguna, España.

Francis, C. A., Beman, J. M., and Kuypers, M. M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME journal*. 1:19-27.

Gardino, A. K., Smerdon, S. J., and Yaffe, M. B. 2006. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: A comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Seminars in Cancer Biology*. 16:173-182.

- Hipkin, C. R. (1989) in *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*. Wray, J. L. and Kinghorn, J. R (Eds). Oxford Science Publications: Oxford. 51-68.
- Gómez-Limón, J.A., y Reig Martínez, E., 2013, Sostenibilidad, La sostenibilidad de la agricultura española, Cajamar Caja Rural, 167-170. Almería. España.
- Machín F, Medina B, Navarro F, Pérez MD, Veenhuis M, Tejera P, Lorenzo H, Lancha A, and Siverio J.M. 2004. The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. 21:265- 276.
- Machín F., Perdomo, G., Pérez, M.D., Brito, N., and Siverio, J.M. 2000. Evidence for multiple nitrate uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*, *FEMS Microbiology Letters*. 194 (2):71-174.
- Magasanik B and Kaiser CA. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 290:1-18.
- Martínez, Y., Uku Karaj, S., and Albiac, J. 2002. El Control de la Contaminación por Nitratos en el Regadío, *Economía Agraria y Recursos Naturales*, ISSN, 115-131.
- Marzluf GA. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 61:17-32.
- Mhawech, P. (2005). 14-3-3 Proteins--an Update. *Cell Research*, 15(4), 228–236.
- Navarro, F.J., Machín, F., Martín, and Siverio, J. M. 2006. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *Journal of Biological Chemistry*. 281(19):13268–13274.
- Navarro, F. J., Martín, Y., and Siverio, J. M. (2008). Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. *Journal of Biological Chemistry*. 283(45): 31208–31217.
- Navarro, F.J, Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machín, F., Guillén, R.M, Lancha, A., Siverio, J.M.; 2003. The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*, *FEMS Yeast Research*. 4(2):149-155.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H. 1998. Major facilitator superfamily. *Micobiol Molec Biol Rev*. 62: 1–34.
- Rodríguez, C., 2011, Represión catabólica por nitrógeno y homeostasis catiónica en la levadura *Hansenula polymorpha*. Papel de Ure2 y de la calcineurina, tesis doctoral, España.
- Tenorio, F.A, Del valle Mondragón, L., Pastelín G. 2005. Validation of a spectrophotometric analytical method for quantifying stable metabolites of nitric oxide in biological fluids, *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 36:31-40.
- Siverio, J.M; 2002 Asimilación de nitratos por levaduras, *FEMS Microbiology Reviews*, 26,3:277-284.
- Siverio, J. M. (2005) *Biochemistry and Genetics of Nitrate Assimilation, in Hansenula polymorpha: Biology and Applications* (ed G. Gellissen), *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, FRG. 3:21-36.
- Van der Klei, I.J., Hibrands, R.E., Swaving, G.J., Waterham, H.R., Vrieling, E.G., Titorenko, V.I., Cregg, J.M., Harder, W., and Veenhuis, M. 1995. The *Hansenula polymorpha* PER3 gene is essential for the import of PTS1 proteins into the peroxisome matrix, *The Journal of Biological Chemistry*, 270:17229-17236.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., and Cantley, L. C. 1997. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 91:961–971.

