



Universidad
de La Laguna



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética

Efecto de las proteínas 14-3-3 en el tráfico intracelular de permeasas en levaduras

Role of 14-3-3 proteins in yeast permeases intracellular trafficking

Trabajo Fin de Grado

Brian Almeida Prieto

Julio 2014

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

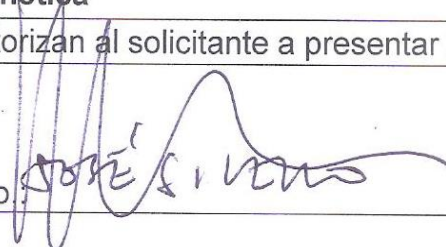
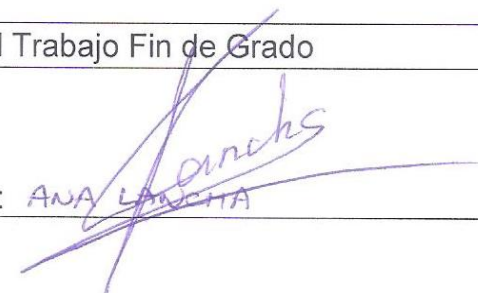
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
54113227T	Brian Almeida Prieto
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
660440429	BrianAlmeida93@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

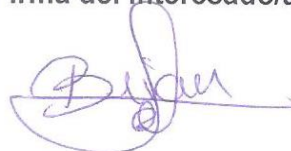
Efecto de las proteínas 14-3-3 en el tráfico intracelular de permeasas en levaduras

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. José M. Siverio	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
y Dña. Ana Lancha Bernal	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo. 	Fdo.: ANA LANCHA 

La Laguna, a 8 de Julio de 2015

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Descubrimiento	1
1.2.	Estructura	1
1.3.	Motivos de unión.....	2
1.4.	Función.....	3
1.5.	Regulación de 14-3-3	4
1.6.	Proteínas 14-3-3 en levaduras	4
1.7.	Asimilación de nitrato por la levadura <i>Hansenula polymorpha</i> . Regulación post-traducciona del transportador de nitrato de alta afinidad Ynt1	5
1.8.	Hipótesis y Objetivos	6
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	7
2.1.	Microorganismos y condiciones de cultivo.....	7
2.1.1.	Cepas de bacterias	7
2.1.2.	Cepas de levaduras	7
2.1.3.	Medios y condiciones de cultivo	7
2.1.3.1.	Cultivo de bacterias	8
2.1.3.2.	Cultivo de levaduras	9
2.2.	Transformación de microorganismos	9
2.2.1.	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	9
2.2.2.	Transformación de <i>Hansenula polymorpha</i>	10
2.3.	Técnicas relacionadas con la manipulación de ADN	11
2.3.1.	Extracción de plásmidos a partir de bacterias	11
2.3.2.	Cuantificación de ADN	12
2.3.3.	Preparación de marcadores de peso molecular.....	13
2.3.4.	Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa	13
2.3.4.1.	Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.	14
2.3.5.	Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.	15
2.3.5.1.	PCR de colonias	16
2.3.6.	Digestión con enzimas de restricción	17
2.3.7.	Ligamiento de moléculas de ADN	17
3.	RESULTADOS	17
3.1.	Construcción del vector p Δ bul2::BLE.....	17
3.2.	Interrupción del gen 14-3-3 en <i>Hansenula polymorpha</i>	20
4.	DISCUSIÓN.....	22
5.	CONCLUSIONES.....	25
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

Las proteínas 14-3-3 son importantes reguladores de múltiples procesos celulares, incluido el tráfico intracelular de permeasas en levaduras. A través de la tecnología del DNA recombinante hemos diseñado y construido un vector recombinante con el gen *BUL2* interrumpido con el marcador de resistencia a la zeocina *ble*. Además hemos sentado las bases para estudiar el efecto de la delección del gen de 14-3-3 en la levadura *Hansenula polymorpha*. Estas cepas servirán para estudiar qué papel juegan las proteínas 14-3-3 en la regulación post-traducciona del transportador Ynt1 en esta levadura. En este trabajo se han utilizado técnicas de PCR, aislamiento de DNA plasmídico, digestión con enzimas de restricción y ligamientos, transformación de bacterias, transformación de levaduras, entre otras, para conseguir nuestros objetivos.

Palabras clave: *14-3-3, arrestina, interrupción génica, permeasa, levadura*

ABSTRACT

14-3-3 proteins are key regulators of multiple cellular process, even yeast permeases intracellular trafficking. Through recombinant DNA technology we have designed and constructed a recombinant vector with *BUL2* gen disrupted with zeocin resistance marker *ble*. Furthermore we have laid the groundwork to study the role of 14-3-3 proteins in the post-translational regulation of Ynt1 permease in this yeast. In this work we have used PCR techniques, plasmid DNA isolation, digestion with restriction enzymes and ligation, bacterial transformation, yeast transformation, among others, to achieve our goals.

Key words: *14-3-3, arrestin, gene disruption, permease, yeast*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descubrimiento

Las proteínas 14-3-3 son una familia de proteínas ácidas y relativamente abundantes, identificadas por primera vez por Moore y Pérez a finales de los años 60 en extractos de cerebro bovino. (Moore & Perez, 1967). 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 (Martin et al., 2003; Duboist et al., 1997; Yaffe et al., 2006; Aitken et al., 1995).

1.2. Estructura

Se trata proteínas diméricas altamente conservadas presentes exclusivamente en eucariotas. Existen siete isoformas en mamíferos (α/β , γ , ϵ , δ/ζ , η , τ y σ , siendo α y δ las formas fosforiladas de β y ζ , respectivamente) (Yaffe et al., 1997), 13 en plantas y 2 en levaduras, *Drosophila* y *C. elegans*. (Guri Tzivion et al., 2006). Aunque existen organismos, como *Giardia duodenalis* (Fiorillo et al., 2014) o la levadura *Candida albicans* (Cognetti et al., 2002), que solo presentan una isoforma.

Estas proteínas pueden formar homo o heterodímeros *in vivo* e *in vitro* (Aitken et al., 1995), pero muestran distintos patrones de unión. Las isoformas 14-3-3 σ y 14-3-3 γ humanas forman homodímeros preferentemente (Benzinger et al., 2005; Aitken et al., 2003), mientras que las isoformas 14-3-3 ϵ de humanos y las isoformas BMH1 y BMH2 de levaduras forman heterodímeros (Aitken et al., 2003).

Cada monómero de 14-3-3 tiene una masa molecular de aproximadamente 30 kDa y su punto isoeléctrico está entre 4-5 (Fu et al., 2000). Los monómeros de 14-3-3 están formados por 9 hélices alfa ($\alpha 1$ - $\alpha 9$), organizados en extremos N y C-terminal, que contienen una región de dimerización localizada en el extremo N-terminal y una región de unión de la proteína diana localizada en la mitad del extremo N-terminal y el C-terminal (Figura 1A). Los residuos de las cuatro primeras hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) forman la interfase de dimerización. La dimerización de ambas moléculas de 14-3-3 crean una estructura en forma de canal (Figura 1B), cuyo interior está compuesto por residuos altamente conservados en todas las isoformas de 14-3-3, mientras que la superficie del dímero muestra residuos variables, posiblemente involucrada en la interacción específica de ciertas isoformas con las proteínas diana. El resto de hélices α ($\alpha 5$ - $\alpha 9$) forman un surco anfipático, responsable de la unión a la proteína diana. Deleciones o

sustituciones de aminoácidos críticos en la región de dimerización, abolen la dimerización de estas proteínas, creando formas monoméricas de 14-3-3 capaces de unirse a la proteína diana, en algunos casos con menor afinidad, pero sin provocar en dicha proteína ningún efecto funcional (Gu & Du, 1998; Tzivion et al., 1998). Del mismo modo, mutaciones que alteran el surco anfipático reducen la interacción de 14-3-3 con las proteínas diana (Wang et al., 1998).

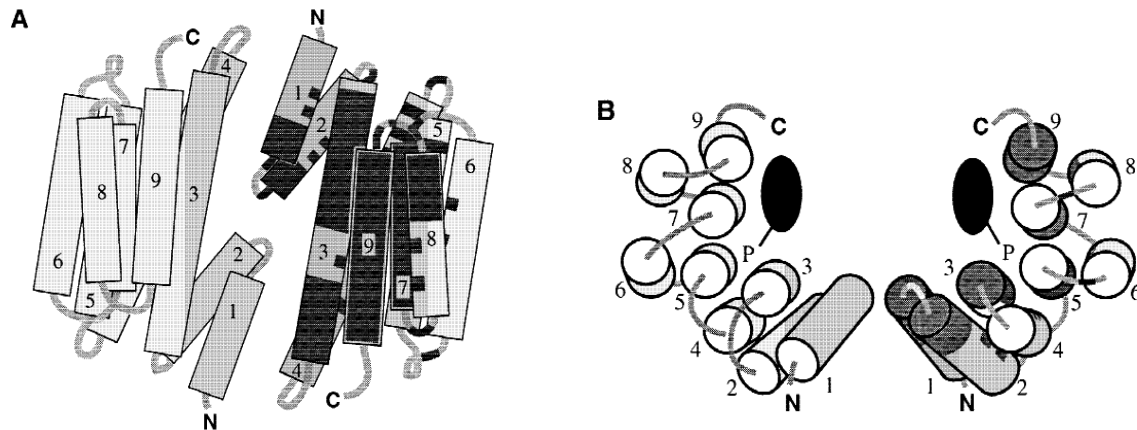


Figura 1. **A)** Estructura esquemática de un dímero de 14-3-3, visión cenital. Los números indican las hélices α . Las regiones conservadas están sombreadas en negro en el monómero de la derecha. **B)** Estructura esquemática de un dímero de 14-3-3 unido a dos ligandos fosforilados, vista lateral. Tomado de Rosenquist, Sehnke, Ferl, Sommarin, & Larsson, 2000.

En algunas isoformas de 14-3-3, un lazo C-terminal puede formar una décima hélice que regula el acceso de las dianas al surco de 14-3-3, funcionando como un dominio autorregulador (Silhan et al., 2004; Truong et al., 2002).

1.3. Motivos de unión

Se han descrito dos motivos canónicos de fosfoserina/fosfotreonina presentes en los ligandos de 14-3-3: RSXpSXP (modo I) y RXXXpS/pTXP (modo II), donde pS y pT representan fosfoserina y fosfotreonina respectivamente. Los detalles estructurales de la interacción de los modos I y II han sido descritos por Yaffe et al., 1997 y Rittinger et al., 1999 respectivamente. Otros motivos consenso para la interacción de 14-3-3 con el ligando han sido descritos, como por ejemplo, pS/pT (X_{1-2})-COOH, localizado en el extremo C-terminal y referido en la bibliografía como modo III (Ganguly et al., 2005). Los motivos anteriores requieren de la fosforilación de la proteína diana para su unión con 14-3-3, sin embargo, otros motivos no fosforilados han sido descritos para la interacción de estas proteínas (Petosa et al., 1998; Aitken, 2002).

Se ha postulado una hipótesis acerca del mecanismo de unión de las proteínas diana con 14-3-3 (Yaffe, 2002). Esta hipótesis, conocida como hipótesis del portero (del inglés,

“*gatekeeper*” hypothesis), postula que para una proteína diana con varios motivos de unión a 14-3-3, uno de ellos actuará como sitio dominante. Si este sitio de unión no está presente o se encuentra desfosforilado, el sitio secundario será demasiado débil para interactuar con 14-3-3, mientras que si el sitio dominante está fosforilado y unido a uno de los monómeros de 14-3-3, el sitio secundario será capaz de interactuar con la otra subunidad del dímero 14-3-3 debido a elevada concentración local como consecuencia de su proximidad.

Este mismo autor sostiene que la estructura del dímero 14-3-3 es bastante rígida debido a las interacciones entre las hélices α . Esto sugiere que 14-3-3 se comporte como un yunque molecular capaz de deformar el ligando al que está unido mientras que el dímero sufre alteraciones estructurales mínimas (Yaffe, 2002).

1.4. Función

Esta familia de proteínas se han visto implicadas en múltiples y diversos procesos celulares, tales como regulación de la protein kinasa C (PKC), exocitosis (Dubois et al., 1997), progresión del ciclo celular, respuesta al daño del DNA, apoptosis, tráfico de proteínas, transducción de señales, metabolismo y regulación transcripcional de la expresión génica (Gardino et al., 2006), así como en la adhesión celular (Mhaweck, 2005) o en respuestas al estrés (Fiorillo et al., 2014), entre otras.

Esta gran cantidad de implicaciones biológicas hacen que determinar el papel de las proteínas 14-3-3 en la célula sea complejo. Sin embargo, sí es posible saber cómo actúan estas proteínas sobre las proteínas dianas, es decir, su modo de acción (Tzivion et al., 2001; Guri Tzivion & Avruch, 2002). Las funciones de 14-3-3 pueden agruparse en 5 categorías: (i) la unión a 14-3-3 puede alterar la habilidad de la proteína diana para interactuar con otras proteínas; (ii) dicha unión también puede modificar la localización de la proteína diana a través de dos mecanismos: por un lado, 14-3-3 puede facilitar el transporte de la proteína diana desde el núcleo a través de secuencias de exportación nuclear (NES, del inglés *nuclear export sequence*) presente en su extremo C-terminal. Por otro lado, 14-3-3 puede enmascarar secuencias de importación al núcleo (NIS, del inglés *nuclear import sequence*). (iii) 14-3-3 puede servir como un adaptador dependiente de fosforilación para acercar dos proteínas dianas; (iv) la unión con 14-3-3 puede alterar la actividad catalítica intrínseca de la proteína diana, inhibiendo o aumentando su función. (v) la unión a 14-3-3 puede proteger a la proteína diana de otras modificaciones como la desfosforilación o la proteólisis.

1.5. Regulación de 14-3-3

La regulación de la propia proteína 14-3-3 es un aspecto a estudiar en profundidad, debido a que la mayoría de estudios sobre 14-3-3 hacen hincapié en su papel como proteína reguladora, pero poco se sabe de esta proteína en sí. Modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la expresión específica de ciertas isoformas, su localización celular o la especificidad diferencial de unión a la diana son algunos de los puntos de regulación de 14-3-3 (Fu et al., 2000; Tzivion et al., 2001).

1.6. Proteínas 14-3-3 en levaduras

A pesar de que muchos de los estudios referentes a las proteínas 14-3-3 están enfocados a humanos, mamíferos o plantas, 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 de eucariota para el estudio de 14-3-3.

Se han descrito genes de 14-3-3 en *Saccharomyces cerevisiae* (Van Heusden et al., 1995), *Schizosaccharomyces pombe* (Ford et al., 1994), *Candida albicans* (Cognetti et al., 2002) y *Yarrowia lipolytica* (Hurtado & Rachubinski, 2002). Sin embargo, es en *S. cerevisiae* y *S. pombe* donde más se han estudiado estas proteínas y ambas contienen dos isoformas.

En *S. cerevisiae*, las dos proteínas 14-3-3, Bmh1 y Bmh2, poseen un 60% de identidad con la isoforma ϵ de mamíferos (Hemert et al., 2001). La interrupción génica de uno de estos genes, *BMH1* ó *BMH2*, tiene efectos poco apreciables, excepto por una ligera reducción en la tasa de crecimiento (Van Heusden et al., 1995). Sin embargo, la doble mutación $\Delta bmh1 \Delta bmh2$ es letal en la mayoría de cepas de laboratorio, a excepción de aquellas derivadas de $\Sigma 1288$, en cuyo caso, la interrupción génica de ambos genes de forma simultánea incrementa la sensibilidad de la cepa a estreses ambientales (Hemert et al., 2001). No obstante, tasas de crecimiento normales pueden ser recuperadas por la expresión heteróloga de ciertas isoformas (Van Heusden et al., 1995; Van Heusden et al., 1996).

En *S. pombe*, los genes *rad24* y *rad25*, presentan una alta homología con respecto a los genes de 14-3-3 de *S. cerevisiae*, *BMH1* y *BMH2*, y entre ellos, a excepción del extremo C-terminal en ambos casos. Interrupciones de uno solo de estos genes, induce a la célula a una mitosis prematura, mientras que la doble interrupción, al igual que en el caso de *S. cerevisiae*, es letal.

1.7. Asimilación de nitrato por la levadura *Hansenula polymorpha*. Regulación post-traducciona del transportador de nitrato de alta afinidad Ynt1

Hansenula polymorpha, es una levadura ampliamente usada en la industria biotecnológica y como organismo modelo para el estudio de la biogénesis y degradación de los peroxisomas, del metabolismo del metanol y la asimilación de nitrato, de la respuesta a estrés por metales pesados o estrés oxidativo, así como para la producción de proteínas heterólogas (Gellissen, 2002). La capacidad de esta levadura de utilizar nitrato y nitrito como única fuente de nitrógeno, a diferencia de las levaduras modelos *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la convierten en un buen modelo para el estudio de la asimilación nitrato.

La asimilación de nitrato consiste en la entrada del anión en célula a través de transportadores específicos y su reducción a nitrito y posteriormente a amonio a través de las nitrato y nitrito reductasas respectivamente. Debido a que este proceso requiere mucha energía, los genes que codifican la maquinaria enzimática involucrada en la asimilación están regulados por un mecanismo denominado Represión Catabólica por Nitrógeno, en la que dichos genes son reprimidos en presencia de fuentes preferentes de nitrógeno como amonio, asparagina o glutamina. Este mecanismo favorece la asimilación de nitrato en ambientes donde prevalecen fuentes de nitrógeno no preferentes y es considerado como una regulación a largo plazo. Además, las enzimas y permeasas están sometidas a una regulación post-traducciona que aportan una respuesta a corto plazo frente a cambios nutricionales (Navarro et al., 2006; Navarro et al., 2008).

H. polymorpha presenta un solo transportador de nitrato/nitrito de alta afinidad conocido como Ynt1 que contiene 12 dominios transmembrana (Pérez et al., 1997), con una región hidrofílica ubicada entre los dominios VI y VII, y colas N y C terminales citosólicas cortas (González, 2014). Ynt1 está incluido en la familia NNP (del inglés *Nitrate/Nitrite Porter*) implicada en el transporte de alta afinidad de nitrato y/o nitrito (Forde, 2000), que además pertenece a la Superfamilia Mayor de Facilitadores (Pao et al., 1998).

La regulación de permeasas está mediada por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y la ubiquitinación. Dichas modificaciones son debidas a la presencia de diferentes elementos reguladores. La serina/treonina protein kinasa Npr1 (del inglés, *Nitrogen permease reactivator 1*) interviene en la fosforilación de varias permeasas relacionadas con nitrógeno, entre las que se encuentra Ynt1 (Martín et al., 2011). Se ha demostrado que la actividad de Npr1 es dependiente de la fuente de nitrógeno y está controlada por la vía de

señalización TOR (Schmidt et al., 1998). Fuentes pobres de nitrógeno inactivan a TOR y éste a su vez proporciona una forma no fosforilada y activa de Npr1; sin embargo, en presencia de buenas fuentes de nitrógeno TOR está activo y Npr1 está fosforilado e inactivo.

En nuestro grupo, Martín y colaboradores (Martín et al., 2011) han demostrado que en condiciones con fuentes preferentes de nitrógeno o en ayuno de carbono, Npr1 está fosforilada y por tanto inactiva. En esas mismas condiciones, Ynt1 es ubiquitinado y es enviado a la vacuola para su degradación bien, desde la membrana plasmática donde es endocitado y dirigido a la vacuola, o bien, es transportado desde la vía sintética a través de la red *trans*-Golgi hasta la vacuola donde es degradado. Sin embargo, en medios con nitrato, libres de nitrógeno o en presencia de una fuente de carbono, Npr1 se encuentra desfosforilado y actúa fosforilando a Ynt1, que es estabilizado en la membrana plasmática. Se desconoce si la fosforilación de Ynt1 a través de Npr1 se produce de forma directa o a través de proteínas auxiliares.

El principal responsable de la ubiquitinación de las permeasas en levaduras es la ubiquitina ligasa Rsp5 (Hetteema et al., 2004; Hicke & Dunn, 2003; Soetens et al., 2001; Blondel et al., 2004; Pizzirusso et al., 2004; Helliwell et al., 2001). Rsp5 no actúa directamente sobre las permeasas, sino que lo hace a través de proteínas auxiliares como Bul1 y Bul2 (Soetens et al., 2001). Esto es consecuente con el hecho de que los niveles de la mayoría de las permeasas disminuyen en presencia de Rsp5 porque no contienen los motivos PY (prolina-tirosina) que interaccionan con los motivos WW (triptófano-triptófano) de Rsp5 (Lin et al., 2008), sin embargo, proteínas como Bul1 y Bul2 sí los contienen, por lo que son capaces de interaccionar con Rsp5 (Soetens et al., 2001) y actuar como nexo entre la permeasa y la ubiquitina ligasa. Ynt1 no contiene los motivos PY que inducirían su ubiquitinación.

Las arrestinas son adaptadores que median en el tráfico intracelular de transportadores en levaduras. Las α -arrestinas, Bul1 y Bul2, median la ubiquitinación y, por ende, la endocitosis de permeasas en levaduras, tal y como ha sido demostrado para otros complejos arrestinas/permeasa (Nikko & Pelham, 2009).

1.8. Hipótesis y Objetivos

Mi Trabajo Fin de Grado se encuadra en un objetivo más general del Grupo del Metabolismo de Nitrógeno consistente en determinar el papel que ejercen las proteínas 14-3-

3 sobre la regulación post-traducciona del transportador de nitrato/nitrito de alta afinidad Ynt1 en la levadura *Hansenula polymorpha*. Así como el papel de las proteínas Bul1 y Bul2 en la acción de 14-3-3 sobre Ynt1.

Los objetivos de mi TFG se han centrado en:

- 1.- Obtención de una cepa conteniendo el gen 14-3-3 delecionado.
- 2.- Diseño y construcción de un vector para la interrupción génica del gen *BUL2* con el marcador de resistencia a la zeocina *ble*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

2.1.1. Cepas de bacterias

Las cepas bacterianas utilizadas fueron las siguientes:

- *E. coli* cepa **DH5 α** : (Δ 80*dlacZ*M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻m_k⁻) supE44 relA1 deoR Δ (*laZYA-argF*) U169. Se usó para la amplificación de ADN plasmídico.*
- **NEB 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)**: *fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. Derivada de *E. coli* DH5 α , se usó para la obtención de ADN plasmídico de alta calidad y para la selección de moléculas de ADN recombinante.
- *E. coli* cepa **SCS110**: *rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB lacIqZAM15]*. Se usó para la obtención de ADN plasmídico no metilado.

2.1.2. Cepas de levaduras

Se usó una cepa doble mutante auxotrófica *leu2⁻ ura3⁻*, derivada de la cepa NCYC 495 de *H. polymorpha*.

2.1.3. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo empleados, tanto sólidos como líquidos, se prepararon en agua destilada y tamponando el pH en los casos requeridos. Para medios sólidos se agregó antes de la esterilización 1,5-2 % (p/v) de Agar Bacteriológico. La esterilización se llevó a cabo en un autoclave, a 121 °C y 1,1 bar de presión durante 20 minutos. Los compuestos termolábiles se

añadieron al medio esterilizado a partir de una solución concentrada y esterilizada por filtración a través de filtros Millex de 0,22 μm (Millipore, EEUU).

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

2.1.3.1. Cultivo de bacterias

Para el crecimiento de cepas bacterianas se usó el medio LB (Luria Bertani) predominantemente y, LB con baja concentración de sales para la selección de bacterias que contuviesen determinados plásmidos recombinantes. En la preparación de células competentes, para la transformación con ADN plasmídico, se usó el medio SOB. La incubación de las células tras la transformación se llevo a cabo en medio SOC, con idéntica composición que el SOB y suplementado además con glucosa 20 mM.

El medio LB con baja concentración de sales se preparó añadiendo NaCl 0,5 % (p/v) y se ajustó a pH 7,5 con NaOH. A este medio se le añadió zeocina (25 $\mu\text{g/ml}$) para seleccionar las cepas portadoras de plásmidos con marcadores específicos de resistencia a este antibiótico. La ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) también fue empleada con este fin en medios LB.

Medio LB	Medio SOC
Triptona 1 % (p/v)	Triptona 2 % (p/v)
Extracto de levadura 0,5 % (p/v)	Extracto de levadura 0,5 % (p/v)
NaCl 1 % (p/v)	NaCl 10 mM
Ajustado a pH 7,0 con NaOH	KCl 2,5 mM
	MgCl ₂ 10 mM ¹
	MgSO ₄ 10 mM ¹

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

La temperatura habitual de crecimiento bacteriano fue de 37 °C en medio sólido y medio líquido. En este último caso, los cultivos se sometieron a agitación orbital de 150-200 rpm. El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 595 nm (DO₅₉₅)

Para la conservación de cepas bacterianas durante largos períodos de tiempo se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en LB conteniendo glicerol al 15 % (v/v).

2.1.3.2. Cultivo de levaduras

El crecimiento de levaduras en medio no selectivo se llevó a cabo en YPD, mientras que para el crecimiento selectivo se utilizó *Yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulfate* (YNB) (DIFCON, EEUU) al 0,17 % (p/v) y glucosa al 2 % (p/v), denominándose YG a este medio. Cuando la fuente de nitrógeno añadida a este medio mínimo consistió en cloruro amónico se denominó YGNH, mientras que cuando fue glutamina se denominó YGQ. Las auxotrofías para la leucina y el uracilo se suplieron añadiendo estos compuestos a unas concentraciones finales de 0,23 mM y 0,18 mM respectivamente, a excepción del medio YGQL en la que la concentración final de leucina fue 1 mM.

Para la selección de células portadoras del gen *ble*, que confiere resistencia al antibiótico zeocina (Invitrogen, EEUU), el medio YPD fue suplementado con este antibiótico a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ a partir de una disolución concentrada de 100 mg/ml, manteniéndose en condiciones de oscuridad.

El crecimiento de *H. polymorpha* se llevó a cabo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, excepto en aquellas cepas termosensibles, que se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando las levaduras se crecieron en medio líquido se utilizó agitación orbital de 150-200 rpm. La determinación del crecimiento en medio líquido se realizó midiendo la densidad óptica del cultivo a 660 nm.

Para la conservación durante largos períodos de tiempo se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio YG con glicerol al 15 % (v/v).

2.2. Transformación de microorganismos

2.2.1. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de bacterias se realizó por choque térmico. En el caso de las competentes de alta eficiencia se utilizó el protocolo descrito por el fabricante (New England Biolab). El método descrito por Chung et al., 1989 se desarrolló para la preparación y transformación de competentes de *E. coli*, pero con resultados poco satisfactorios, por lo que finalmente se siguió el protocolo descrito por Hanahan, 1986, tanto para la preparación de células competentes, como para su transformación.

Para la obtención de células competentes de *E. coli* se partió de un precultivo (5 ml) crecido hasta fase estacionaria en LB del que se tomaron 0,9 ml para inocular 150 ml de SOB. Se incubó el cultivo a 37 °C hasta una DO₅₉₅ de 0,4-0,6; entonces se enfrió sobre hielo durante 20 min y a continuación se centrifugó a 2400 x g (5.000 rpm) durante 5 min a 4 °C. Posteriormente las células se resuspendieron en 50 ml de tampón RF1 frío y se incubaron en hielo durante 20 min más. Tras este tiempo, las células se recogieron nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en 12 ml de tampón RF2 frío y se incubaron 20 min en hielo. Finalmente se distribuyeron en alícuotas de 200 µl para su conservación a -80 °C o para su uso inmediato.

RF1	RF2
RbCl 100 mM	MOPS 10 mM
MnCl ₂ 50 mM	RbCl 10 mM
Acetato de sodio 30 mM	CaCl ₂ 75 mM
CaCl ₂ 10 mM	Glicerol 15 % (v/v)
Glicerol 15 % (v/v)	

Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético.

Ajustar el pH a 6,8 con ácido acético.

Esterilizar por filtración.

Esterilizar por filtración.

Para la transformación por choque térmico se añadió a las células descongeladas el ADN plasmídico (en un volumen no superior a 10 ml), incubándose la mezcla en hielo durante 30 min. A continuación, se sometió a choque térmico durante 90 s a 42 °C, y se incubaron inmediatamente en hielo durante 2 min. Se añadieron 800 µl de SOC y se incubó la mezcla a 37 °C durante 1 hora. Finalmente las células se recogieron por centrifugación a 16200 x g (13000 rpm) durante 30-60 s y se sembraron en placas de LB Agar suplementadas con los antibióticos adecuados.

2.2.2. Transformación de *Hansenula polymorpha*

La preparación y transformación de células competentes de *H. polymorpha* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Faber et al. (1994).

Para la obtención de células competentes se partió de un precultivo crecido hasta saturación a 37 °C en medio líquido YPD. A continuación se inocularon aproximadamente 1 ml en 50 ml de YPD precalentado a 37 °C en agitación, dejando crecer el cultivo hasta fase

exponencial (DO_{660} 1,2-1,5). En ese momento, se recogieron las células por centrifugación a $2400 \times g$ (5.000 rpm) durante 7 min y se resuspendieron en 10 ml de tampón fosfato (KPi) suplementado con DTT a una concentración final de 25 mM. Las células, en estas condiciones, se incubaron a $37^\circ C$ durante 15 min, para luego recogerlas por centrifugación y lavarlas dos veces con tampón de electropermeabilización frío (STM). Un primer lavado con 50 ml de tampón y un segundo con 25 ml, recogiendo las células entre cada paso por centrifugación a $4863 \times g$ (5.000 rpm). Finalmente, se resuspendieron en 0,25 ml de STM y se separaron en alícuotas de 60 μl que se usaron inmediatamente o se congelaron a $-80^\circ C$ hasta su posterior uso.

KPi	STM
KH_2PO_4 1 M	Sacarosa 270 mM
K_2HPO_4 1 M	Tris-HCl 10 mM pH 7,5
Ajustar el pH a 7,5	$MgCl_2$ 1 mM

Para la transformación de las células se le añadió a los 60 μl de células competentes 0,8-1 μg de ADN purificado en un volumen de entre 2 y 10 μl de agua. Esta mezcla se depositó en el fondo de una cubeta de electroporación, con una distancia de separación entre electrodos de 2 mm, (VWR, EEUU) previamente enfriada en hielo. Para transformar las células se utilizó un electroporador BTX 600 (BTX Inc., EEUU) sometiendo las células a un campo eléctrico de 7,5 kV/cm (50 mF de capacitancia y 129 W de resistencia), lo que resultó en un pulso eléctrico de aproximadamente 5 ms. A continuación se añadió rápidamente 1 ml de YPD a la cubeta, se mezcló con las células transformadas y se transfirió la mezcla a un tubo de 1.5 ml. Tras incubar las células a $37^\circ C$ durante 1 h se recogieron a $16200 \times g$ (13000 rpm) durante 1 min y se lavaron con 1 ml de agua. Finalmente, las células se resuspendieron en 150 μl de agua y se sembraron en dos placas con el medio selectivo adecuado. Las posibles colonias (transformantes) aparecieron después de 2-3 días de incubación.

2.3. Técnicas relacionadas con la manipulación de ADN

2.3.1. Extracción de plásmidos a partir de bacterias

Para la obtención de plásmidos a partir de bacterias se utilizaron dos procedimientos en función de la calidad del ADN que se quisiera obtener. En los casos en los que el interés era obtener un plásmido de alta pureza se usó el kit comercial para la extracción de plásmidos “*QIAprep[®] Spin Miniprep*” (QIAGEN). Este kit se basa en el método de lisis alcalina

(Bimboim & Doly, 1979), que consiste en utilizar un pH alto para lisar las células bacterianas, y seguidamente el lisado es neutralizado y ajustado a condiciones de alta concentración de sales para favorecer la absorción del ADN a una membrana de sílica gel, de la cual se eluye con 20 µl de agua estéril.

Para verificar construcciones de plásmidos recombinantes se utilizó un método más rápido y económico (miniprep rápida). Con una punta de pipeta estéril de inocularon tubos de vidrio que contenían 2 ml de medio líquido LB más ampicilina como antibiótico selectivo y se incubaron durante la noche bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1.3.1. A continuación se trasvasó el contenido a tubos de 1,5 ml y se centrifugó a 16.060 x g (13.000 rpm) durante 1 min, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pella en 100 µl de STET. Esta mezcla se incubó en un baño con agua hirviendo durante 1 min y se dejó reposar 5 min en hielo. Seguidamente se centrifugó la mezcla a 16200 x g (13000 rpm) y se retiró la pella con ayuda de un palillo estéril para eliminar los restos celulares y ADN cromosómico. El ADN plasmídico, presente en el sobrenadante, se precipitó durante 5 min con 100 µl de isopropanol. El precipitado se recogió mediante centrifugación a 16.060 x g (13.000 rpm), 5 min y posterior lavado con etanol al 70 % (v/v) frío. Tras retirar el exceso de etanol mediante evaporación a 37 °C se resuspendió el sedimento en 20 µl de agua.

STET

Sacarosa 8 % (p/v)

Tritón X-100 5 % (v/v)

EDTA 50 mM

Tris-HCl 50 mM pH 8,0

2.3.2. Cuantificación de ADN

La estimación semicuantitativa de la concentración de ADN se obtuvo mediante tinción de los geles de electroforesis con un agente intercalante como bromuro de etidio o GelRed™ (Biotium, EEUU) y su exposición sobre luz UV (302 nm). La fluorescencia emitida por las muestras problema se comparó con la emitida por una serie de marcadores de peso molecular y cantidad de ADN conocidas. El patrón de peso molecular utilizado rutinariamente fue el fago λ (Promega, EEUU) digerido con la enzima de restricción *BstEII*, la cual genera un conjunto de fragmentos de 0,7 a 8,5 kpb.

2.3.3. Preparación de marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular se obtuvieron por digestión del ADN del fago λ con la enzima de restricción *BstEII*. La digestión se realizó a partir de 200 μ l de DNA a una concentración inicial de 0,465 μ g/ μ l con 10 μ l de la enzima (10 U/ μ l) hasta alcanzar un volumen de reacción de 2 ml. Tras añadir tampón de carga hasta una concentración final de 1X se obtuvo una concentración final de DNA de 0,05 μ g/ μ l.

Marcadores de Peso Molecular DNA fago λ digerido con *BstEII*

ng (en 5 μ L)		kpb
43.9 ng	■	8.45
37.6 ng	■	7.24
33.1 ng	■	6.36
29.5 ng	■	5.68
25.1 ng	■	4.82
22.5 ng	■	4.32
19.1 ng	■	3.67
12 ng	■	2.32
10 ng	■	1.92
7 ng	■	1.37
6.5 ng	■	1.26
3.64 ng	■	0.7

Tampón de carga

Azul de bromofenol 0,42 % (p/v)
Verde de xilén cianol 0,42 % (p/v)
Glicerol 50 % (v/v)

Figura 2. Representación esquemática de los marcador de peso molecular.

2.3.4. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa sumergidos se usó para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN. De este modo se separaron fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre 0,3 y 10 kpb. Los geles de agarosa se prepararon a una concentración del 0,7-1 % (p/v) en tampón TAE 1X en función del tamaño (pb) de los fragmentos de ADN a separar. En un pocillos del gel se cargaron 5 μ l del marcador de peso molecular y en el resto de pocillos se cargaron 10-20 μ l de las muestras problemas disueltas en tampón de carga.

La electroforesis se realizó con una diferencia de potencial constante de 100 V (y aproximadamente 75 mA de intensidad) y el avance en el gel se visualizó por los colorantes del tampón de carga, el azul de bromofenol y el verde de xilén cianol. Una vez terminada la electroforesis los geles fueron sumergidos durante 15-20 minutos en una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 mg/ml. El ADN se visualizó exponiendo el gel a luz ultravioleta en un transiluminador a 302 nm. Sin embargo, dado el alto riesgo potencial del bromuro de etidio, que además de ser un compuesto altamente cancerígeno es una sustancia lipofílica, lo cual le permite penetrar rápidamente la piel, se prefirió reemplazar el bromuro de etidio por otro agente intercalante que permitiera visualizar los resultados ofreciendo menos riesgo. Esta sustancia fue el GelRed™ (Biotium, EEUU), que se añadió al gel antes de que éste solidificase. Los resultados también fueron visualizados por la exposición del gel a luz ultravioleta a 302 nm. Los resultados de la electroforesis fueron documentados empleando el equipo fotográfico *Gel Doc XR* (Bio-Rad Laboratories). El tamaño y cantidad de los fragmentos separados se estimó mediante comparación con los marcadores de tamaño molecular y cantidad conocidos.

Tampón TAE 50X

Tris 2 M

Ácido Acético glacial 0,57 % (v/v)

EDTA 0,5 M

2.3.4.1. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Para aislar fragmentos de ADN específicos se realizó primero la electroforesis en geles de agarosa con el fin de separar los fragmentos del resto de material genético presente. Una vez identificadas las bandas sobre el transiluminador UV, se seccionó el gel con un bisturí estéril retirando el trozo de agarosa que contenía el fragmento de interés. La purificación del ADN se realizó utilizando el kit comercial *High Pure PCR Product Purification* (Roche) que, de forma breve, consiste en disolver el gel de agarosa en tampón de enlace a 56 °C, añadir isopropanol y transferir la mezcla a una columna que contiene una matriz de sílica gel que fija el ADN, el cual es posteriormente liberado mediante la adición de agua estéril.

2.3.5. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido utilizada en este trabajo con los distintos fines: identificación de clones de bacterias y levaduras que portan fragmentos de ADN de interés, obtención de fragmentos de ADN para transformar levaduras y confirmación de la interrupción de una secuencia génica en levaduras.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 0,2 ml y en volúmenes comprendidos entre 10-25 μ l. Se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas:

Cebador <i>forward</i>	20 μ M
Cebador <i>reverse</i>	20 μ M
Tampón <i>Taq</i> polimerasa	1X
dNTPs	0,2 mM
<i>Taq</i> polimerasa	1-2 U

La ADN polimerasa usada fue la *Taq* ADN polimerasa de la marca GENSCRIPT (EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tampón *Taq* ADN polimerasa 10X empleado estaba compuesto por: Tris-HCl 100 mM (pH 9,0), KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM y Triton X-100 1%.

Las condiciones bajo las cuales se realizaron todas las PCR se describen en la siguiente tabla:

	Temperatura	Tiempo
	94 °C	2-5 minutos
30 ciclos	94 °C	30 segundos
	T _a (5 °C por debajo de T _m de los cebadores)	30-45 segundos
	72 °C	Tiempo extensión ¹
	72 °C	5-7 minutos

¹Corresponde a 1 minuto por cada kpb de ADN a amplificar.

En ciertos casos se requirió que los productos de PCR fuesen purificados para eliminar las sales presentes en el medio. Con este fin se empleó el kit comercial *High Pure PCR Product Purification* (Roche).

2.3.5.1. PCR de colonias

La aplicación de ADN a partir de ADN molde sin purificar es de gran utilidad; sobre todo cuando se pretendía identificar la existencia de algún fragmento de interés. Tanto para la PCR de colonias de bacterias como de levaduras se empleó el protocolo descrito en el apartado anterior con modificaciones en el molde. Para ambos tipos de colonias se ordenaron previamente los clones en una placa del medio selectivo adecuado.

Para la PCR de colonias de bacterias se resuspendió en 20 µl de tampón TE una pequeña cantidad de células con una punta estéril de pipeta en tubos de 0,2 ml. Para realizar un cribado más amplio, en ocasiones se incluyeron hasta 4 colonias distintas previamente ordenadas en placas de LB con ampicilina. La suspensión celular se incubó a 98°C durante 2 min con ayuda de un termociclador, se centrifugó a 16200 x g (13000 rpm) durante 1 min y se tomó 1 µl para la mezcla de PCR.

Dos métodos fueron empleados para la PCR de colonias de levaduras con diferencias importantes en cuanto a la eficacia. El primer protocolo fue adaptado de Packeiser et al., 2013. Se transfirieron células de una colonias a un tubo de 1,5 ml con ayuda de una punta de pipeta estéril y se resuspendió en 20 µl de tampón de lisis Y-PER™ (Thermo Scientific, EEUU). Esta mezcla se diluyó con 180 µl de tampón TE y se centrifugó a 16200 x g (13000 rpm) durante 1 min. Se usó 1 µl del sobrenadante para análisis por PCR. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos por Packeiser et al., este método no fue efectivo para la PCR de colonias en *H. polymorpha*.

TE

EDTA 1 mM

Tris-HCl 10 mM pH 8,0

El método rutinariamente usado y que mostró mejores resultados se realizó rompiendo las células con bolas de vidrio. Se resuspendió una pequeña masa de células en 20 µl de tampón TE en tubos de 1,5 ml. Se añadieron bolas de vidrio de 0,5 mm Ø hasta alcanzar 3/4 partes del volumen de la suspensión. Se agitaron los tubos en un homogeneizador FastPrep24 (MP

Biomedicals) a 4 m/s durante 20 s, se centrifugaron a 16200 x g (13000 rpm) durante 1 min y se añadió 1 µl de ADN molde a la mezcla de PCR.

2.3.6. Digestión con enzimas de restricción

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción persiguió varios objetivos: caracterizar, identificar y construir nuevas moléculas de ADN. Las digestiones se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (temperatura y tampón de la reacción). Se utilizaron de 5 a 10 U de enzima por cada µg de ADN en un volumen de 20-100 µl.

2.3.7. Ligamiento de moléculas de ADN

Una vez preparados y purificados vector e inserto se procedió a ligarlos en un volumen total de reacción de 10 µl con una proporción vector:inserto de 1:3. Para calcular la cantidad de inserto a partir de una cantidad conocida de vector se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{ng del inserto} = \frac{\text{ng del vector} \times \text{kpb inserto}}{\text{kpb vector}} \times \text{proporción molar de inserto/vector}$$

Para el ligamiento de moléculas de ADN se utilizó 1 U de ADN ligasa del fago T4 (Promega) y el tampón correspondiente de la enzima (Tris-HCl 300 mM pH 7.8; MgCl₂ 100 mM; DTT 100 mM; ATP 10 mM). Otro método de ligamiento también fue empleado de forma paralela al anterior. Se usó el sistema *LigaFast™ Rapid DNA Ligation* (Promega). Ambos sistemas difieren en la composición del tampón empleado (Tris-HCl 60 mM pH 7.8; MgCl₂ 20 mM; DTT 20 mM; ATP 2 mM; PEG 10 %) y en el tiempo de reacción, el primero 3 h, mientras que para el segundo bastó con 5 min, ambos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*.

3. RESULTADOS

3.1. Construcción del vector pΔbul2::BLE.

Con el objetivo de estudiar la regulación de la familia de proteínas Bul en el tráfico intracelular del transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad Ynt1 en *H. polymorpha*, se decidió crear un vector que contuviese el gen que codifica la proteína Bul2 interrumpido con el marcador de resistencia a la zeocina *ble*. Esta construcción se usará para interrumpir el gen *BUL2* en *H. polymorpha* mediante reemplazamiento de la copia silvestre por la mutada.

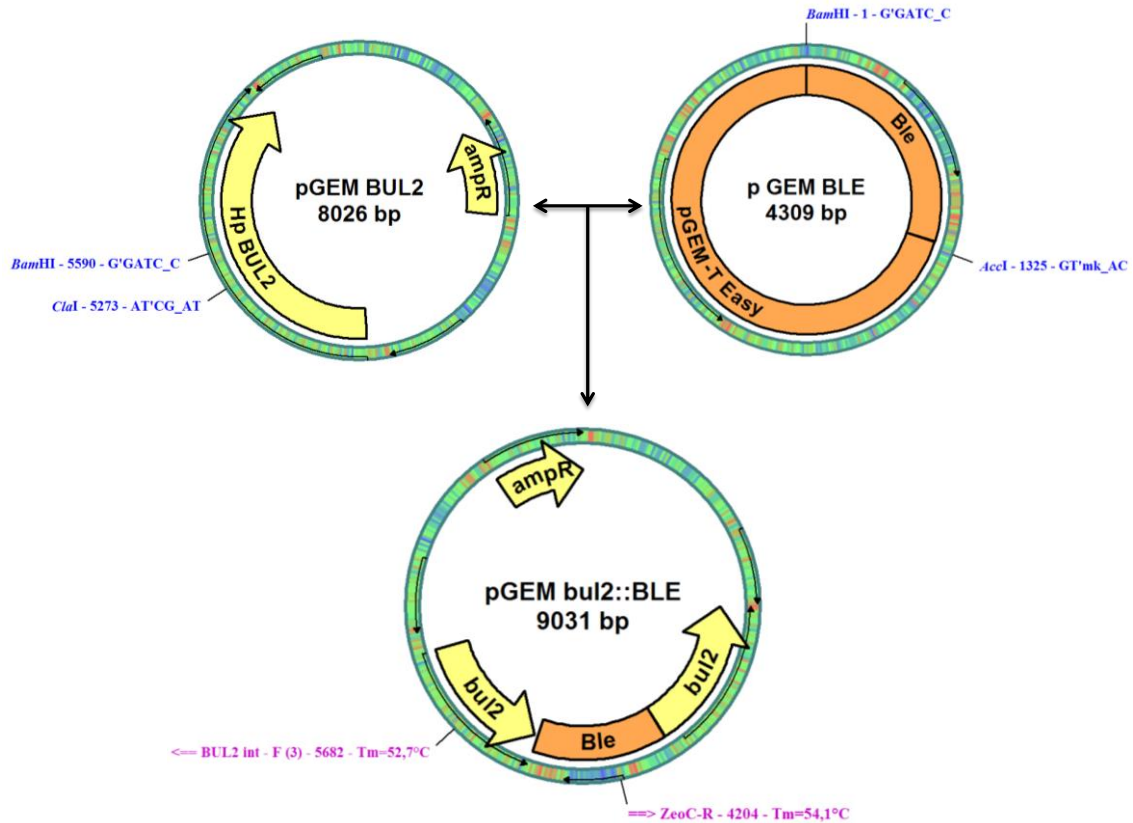


Figura 3. Construcción del plásmido pΔbul2::BLE. Se deletionó una región de la ORF del gen *BUL2* de 317 pb con las enzimas *Bam*HI y *Cla*I, en la que se insertó un fragmento de 1324 pb que contenía el gen de resistencia a la zeocina *BLE*.

El procedimiento para construir este vector se ilustra en la Figura 3. En esencia se trata de producir una deleción e inserción en el gen *BUL2*. El gen insertado *ble* proporciona resistencia al antibiótico zeocina. El primer paso fue la digestión con enzimas de restricción de los plásmidos que contenían los respectivos genes. Estos plásmidos utilizaban el sistema de vectores pGEM[®]-T. El gen *BUL2* fue digerido con las enzimas de restricción *Cla*I y *Bam*HI, que generaron dos fragmentos, de 7709 pb y 317 pb. El fragmento menor se corresponde con parte de la ORF del gen *BUL2*, mientras que el fragmento mayor se corresponde con el resto de la ORF más el gen de resistencia a la ampicilina (*amp^R*). Con respecto al gen *ble*, se realizó una digestión con las enzimas *Bam*HI y *Acc*I, generando dos fragmentos, de 2985 pb y 1324 pb respectivamente, este último contenía la ORF de *ble*. Tras el aislamiento y purificación de los fragmentos de 7709 pb y 1324 pb de los genes *BUL2* y *ble* respectivamente, se realizó una reacción de ligamiento que fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli*. De esta forma se obtuvo el vector pΔbul2::BLE de 9031 pb. La verificación del vector se llevó a cabo, en primer lugar, creciendo los transformantes en placas de LB con baja concentración de NaCl y zeocina (Figura 4), de esta forma sólo aquellos transformantes que hayan

incorporado el plásmido recombinante p Δ bul2::BLE podrán crecer, debido a la copia funcional del gen de resistencia a este antibiótico. Tras observar el crecimiento de algunos transformantes sobre este medio, se procedió a realizar una PCR de colonias con el fin de verificar realmente la presencia del vector. Para la PCR se usaron los oligos BUL2 int-F(3) (5'-TGGGGAGAAAACAAAAATGC-3') y ZeoC-R (5'-TATCGACAAAGGAAAAGGGG-3') que debería generar un fragmento de 1517 pb, sin embargo, los resultados de este análisis no son definitivos.

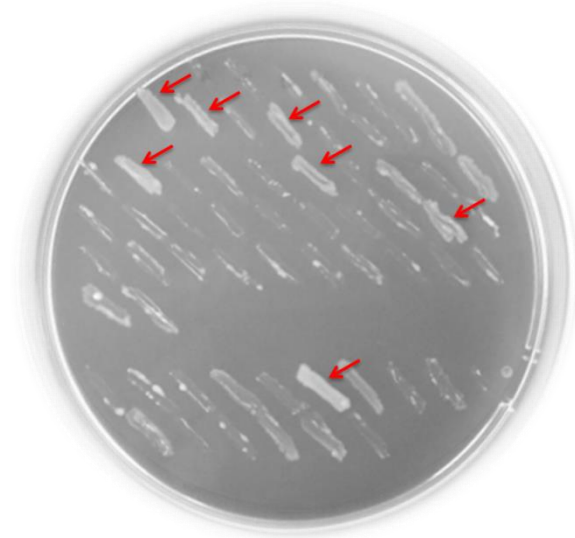


Figura 4. Selección de clones de *E. coli* resistentes a la zeocina. La verificación del vector p Δ bul2::BLE tras la transformación de células competentes de *E. coli* se realizó en el medio LB NaCl 0,5 % (p/v) junto al antibiótico zeocina. Esta estrategia se usó para discriminar los clones Zeo^R. Las flechas rojas indican los clones elegidos para la verificación por PCR.

Una vez verificado el vector, aquellos clones positivos deberán crecerse en LB junto con el antibiótico ampicilina para extraer el vector p Δ bul2::BLE. Para la interrupción de este gen en *H. polymorpha* se usará la estrategia de sustitución de la copia genómica y funcional del mismo por una copia deletada y que contenga el gen *ble*, tras un evento de doble recombinación homóloga. Mediante PCR con los oligos BUL2 ext-F(5) (5'-CCCACTCGTATGCCAAGTTT-3') y BUL2-R (5'-TGATCCGTCTTTGGTGA TGA-3') del plásmido se debería obtener un fragmento de 4706 pb en el que el gen *BLE* estaba flanqueado por regiones homólogas a *BUL2* de 2431 pb en 5' y 984 pb en 3'. Con este fragmento se transformará una cepa silvestre *ura⁻ leu⁻* de *H. polymorpha* y posteriormente se realizarán PCR de colonias para determinar los transformantes en los que tuvo lugar la sustitución de la copia genómica por la copia deletada del gen (Figura 5). En esta PCR de colonias los oligos a utilizar serán BUL2-R y Z2-F (5'-TAAACCATGGCCAAGTTGACC-3') que amplifican un fragmento de 3354 pb solo cuando ha tenido lugar la doble recombinación homóloga.

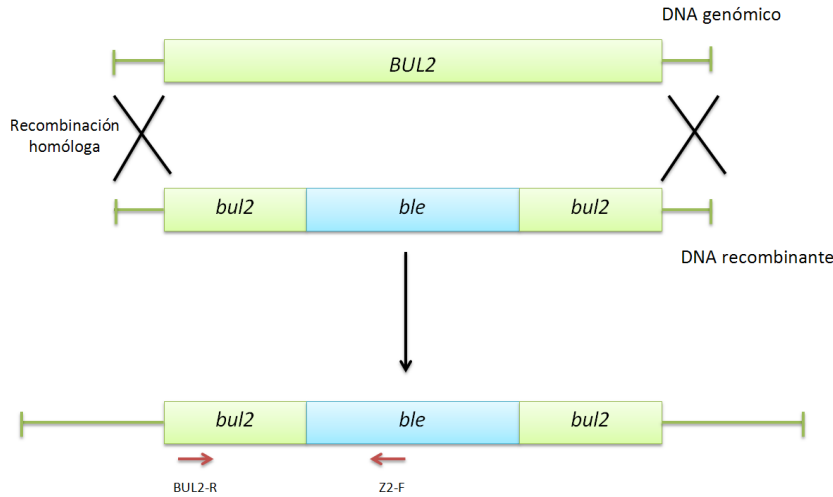


Figura 5. Esquema del proceso de reemplazamiento de la copia genómica y funcional del gen *BUL2* por la copia deletada y de la PCR de colonias para verificar el vector.

3.2. Interrupción del gen 14-3-3 en *Hansenula polymorpha*.

La comparación de secuencias homólogas a Bmh1, una de las dos proteínas 14-3-3 en *S. cerevisiae*, en la levadura metilotrófica *H. polymorpha* solo muestra una coincidencia (<http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2>), es decir, solo se ha identificado una ORF que codifique una proteína 14-3-3 en el genoma de esta levadura. El alineamiento de la proteína 14-3-3 de *H. polymorpha* con sus homólogos en *S. cerevisiae*, Bmh1 y Bmh2, muestra un 84 % y 83% de identidad respectivamente (Figura 6).

Hp 14-3-3	1	MPASREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKAVASSGQELSVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRI	63
Sc Bmh1	1	MSTSREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKTVASSGQELSVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRI	63
Sc Bmh2	1	MSQTREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKAVASSGQELSVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRI	63
Hp 14-3-3	64	VSSIEQKEEAK-GNETQVSLIREYRAKIEEELSNICEDILTVLTQHLIPTAQSGESKVFYKMKGDYH	130
Sc Bmh1	64	VSSIEQKEESKEKSEHQVELICYSYRSKIETEL-TKISDDILSVLDSHLIPSATTGESKVFYKMKGDYH	131
Sc Bmh2	64	VSSIEQKEESKEKSEHQVELIRSYRSKIETEL-TKISDDILSVLDSHLIPSATTGESKVFYKMKGDYH	131
Hp 14-3-3	131	RYLAEFVTEKRKEAADLSLEAYKAASEVAVTELPPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDRACHLAK	197
Sc Bmh1	132	RYLAEFSSGDAREKATNASLEAYKTASE-IATTELPPTHPIRLGLALNFSVFYIEIQNSPKACHLAK	198
Sc Bmh2	132	RYLAEFSSGDAREKATNSLEAYKTASE-IATTELPPTHPIRLGLALNFSVFYIEIQNSPKACHLAK	198
Hp 14-3-3	198	QAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDMSEAGQDEPA-PE-KAA-EKP-DDE*	257
Sc Bmh1	199	QAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDMSESGQAEDQQQQQQHQQQP	258
Sc Bmh2	199	QAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSD--ISESGQEDQQQQQQQQQQQQ	258

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de 14-3-3 en *H. polymorpha* y *S. cerevisiae*. En rojo se marcan los dominios conservados con respecto a 14-3-3 de *H. polymorpha*.

El procedimiento para construir este vector se ilustra en la Figura 7. El primer paso fue la digestión con la enzima de restricción *StuI* del plásmido pGEM URA3, lo que generó dos fragmentos, con tamaños de 3025 pb y 2015 pb. El fragmento de mayor tamaño se

corresponde con el sistema de vectores pGEM T-easy (Promega), mientras que el fragmento de menor tamaño contenía el gen *URA3*. A continuación se realizó una PCR del plásmido pGEM 14-3-3 con los oligos 14-3-3 F2 (5'-TTGAGATGATGCCATCCAGA-3') y 14-3-3 R (5'-TACAGCTGAGGCGGATTCTT-3'), generando múltiples copias funcionales del gen de 14-3-3 de *H. polymorpha*. Este fragmento se insertó en un nuevo sistema vector pGEM con la finalidad de eliminar un sitio de corte de la enzima de restricción *HindIII*, que posteriormente se usó para deleccionar el gen de 14-3-3. Debido a que el corte con la enzima *StuI* genera extremos romos y la enzima *HindIII* genera extremos cohesivos, se recurrió al fragmento *klenow* de la ADN polimerasa para rellenar los extremos generados por *HindIII*. A continuación se realizó el ligamiento con la T4 ligasa y se transformaron células competentes de *E. coli*. La verificación del vector pΔ14-3-3::URA3 se llevó a cabo por PCR de colonias con los oligos 14-3-3 F y URA3 extII-R. Finalmente, a los clones positivos se les extrajo el vector con el cual se realizó otra PCR con los oligos 14-3-3 F2 y 14-3-3 R y el producto de PCR se utilizó para la transformación de células competentes de *H. polymorpha*.

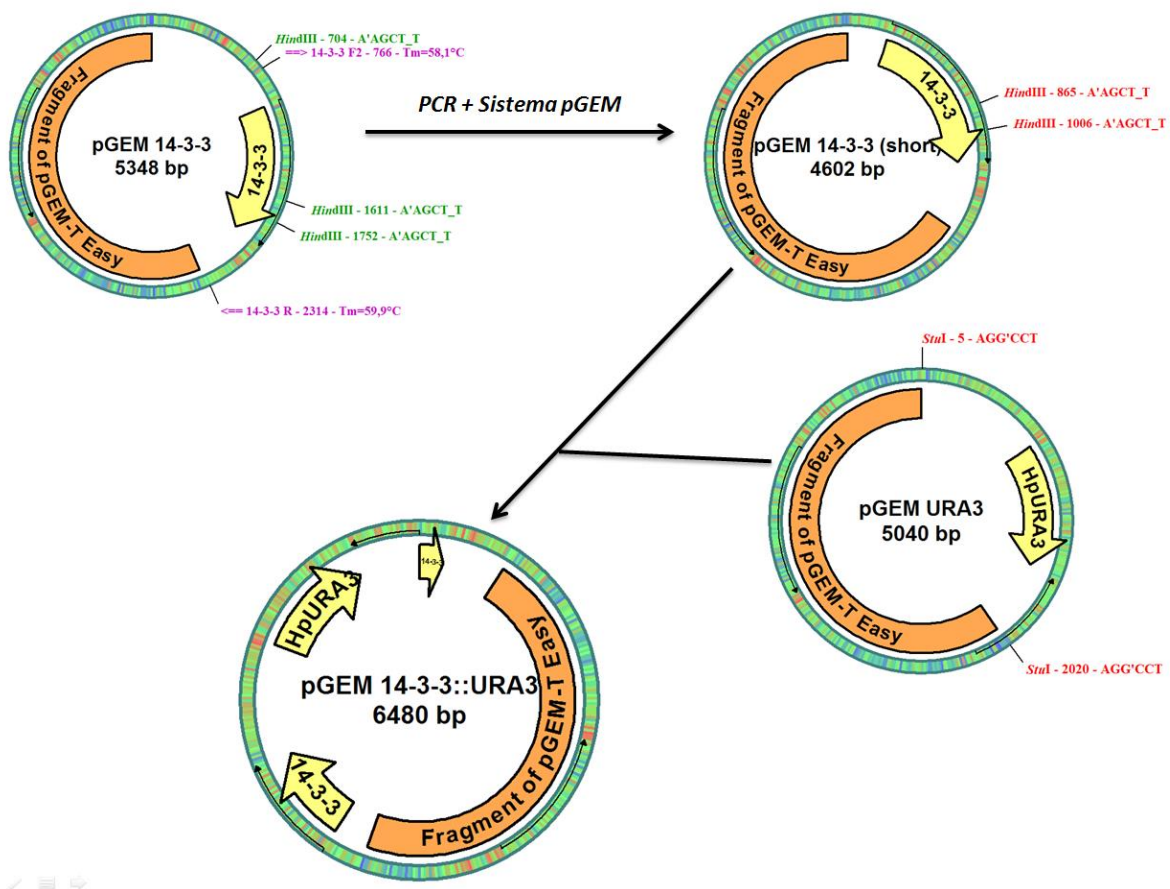


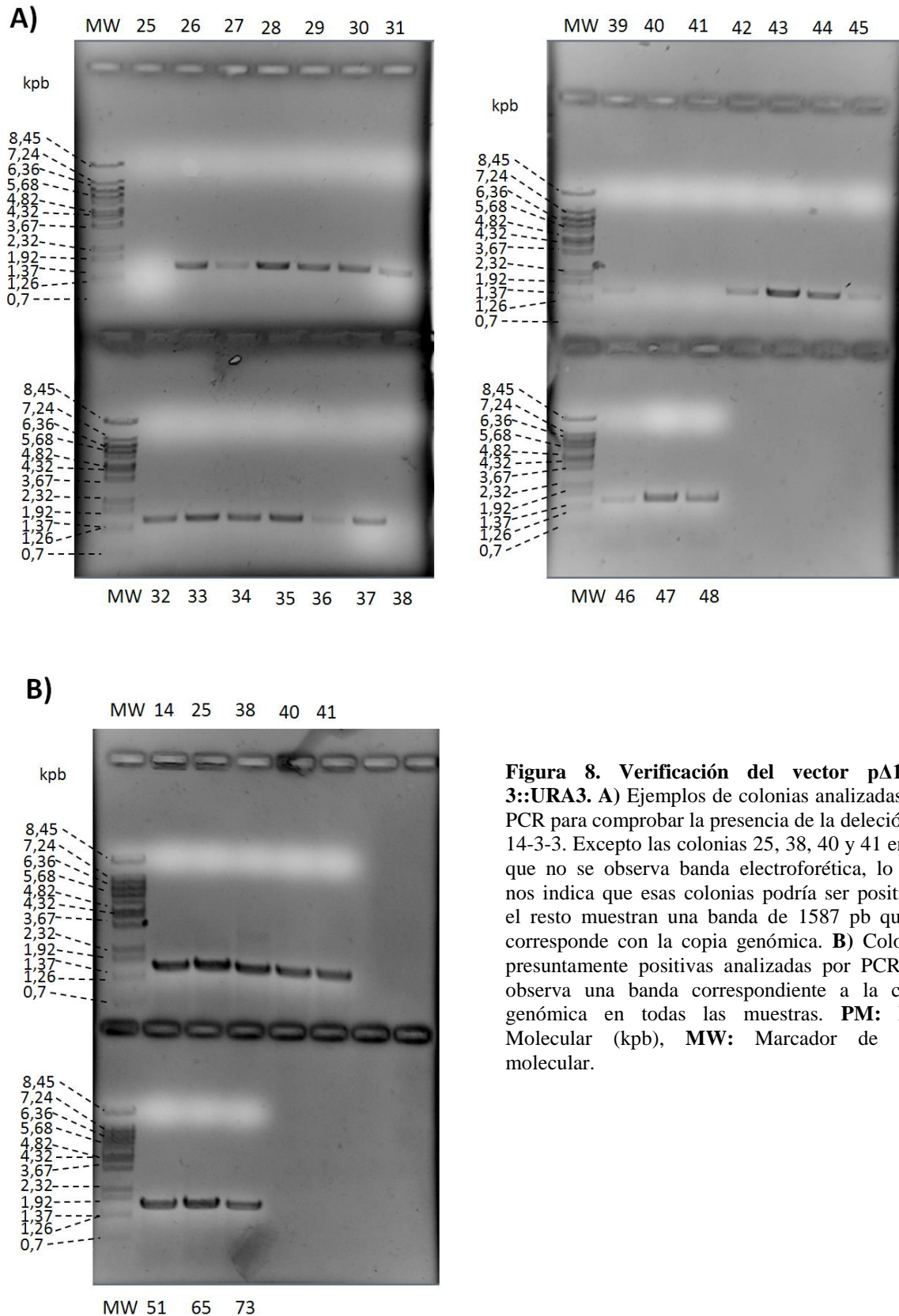
Figura 7. Construcción del plásmido pGEM 14-3-3::URA3. La PCR del plásmido pGEM 14-3-3 permitió generar fragmentos funcionales del vector y tras su inserto en el sistema de vectores pGEM® se consiguió eliminar uno de los tres sitios de corte de *HindIII*. Esta enzima se usó para deleccionar una región de 141 pb de la ORF de 14-3-3 en la que se insertó un fragmento de 2015 pb que contenía el gen marcador *URA3*.

Para seleccionar los clones positivos, es decir, aquellos que presentaban el gen 14-3-3 de *H. polymorpha* delecionado y que contenía el gen marcador *URA3*, se realizaron PCR de 100 colonias con los oligos 14-3-3 F2 y 14-3-3 R. De esta forma se realizó un rastreo negativo, en el que se pudieron detectar por electroforesis en gel de agarosa una banda de 1587 pb correspondiente a la copia genómica del gen y otra banda de 3465 pb correspondiente a la copia delecionada. La presencia de ambas bandas o solo la de menor tamaño indicaban que el clon no había sustituido la copia genómica por la copia delecionada, mientras que la presencia de la banda de mayor tamaño o la ausencia de bandas indicaron un posible transformante positivo (Figura 8A). Las colonias presuntamente positivas fueron analizadas de nuevo por PCR para comprobar la consistencia de los resultados mostrados en la Figura 7A. Los oligos utilizados fueron los mismos que en el paso anterior. Ninguna colonia ha sido identificada con la construcción p Δ 14-3-3::URA3 (Figura 8B).

4. DISCUSIÓN

La construcción del vector pbul2 Δ ::BLE requiere más análisis para verificar la presencia del vector en los transformantes obtenidos, tal y como se indica en el apartado 3.1. Los análisis por PCR desarrollados hasta el momento para este fin muestran una contaminación y no hemos sido capaces de localizar el foco de contaminación. Este vector ha sido construido a partir de la digestión de dos vectores, pGEM BUL2 y pGEM BLE, y los fragmentos de 7709 pb y 1324 pb generados respectivamente fueron ligados por la T4 ligasa para generar el vector. La digestión del plásmido pGEM BUL2 produjo un gran retraso en el desarrollo de este trabajo debido a que una de las endonucleasas de restricción empleadas es sensible a la metilación, por lo que el plásmido pGEM BUL2 tuvo que extraerse de cepas no metiladas para su posterior digestión. La reacción de ligamiento fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* y un rastreo de los clones fue necesario para determinar cuáles eran positivos. De estos clones se extraerá el vector construido y por PCR se amplificará un fragmento que permita transformar levaduras con esta construcción. El vector pbul2 Δ ::BLE podrá ser utilizado para la construcción de cepas mutantes en *H. polymorpha* que permitan estudiar la implicación de estas proteínas en el transporte de nitrato y nitrito por la permeasa Ynt1, así como su interacción con las proteínas 14-3-3. Merhi y André han demostrado que la familia de proteínas Bul están implicadas en la ubicuitinación de la permeasa Gap1 en *S. cerevisiae* (Merhi & Andre, 2012). En fuentes no preferentes de nitrógeno Gap1 es fosforilada por la kinasa Npr1, estabilizando este transportador en la membrana. Sin embargo, en condiciones donde las fuentes de nitrógeno son ricas, Npr1 es inactivo y las proteínas Bul

junto a 14-3-3 median la ubiquitinación de Gap1 a través de la ubiquitina ligasa Rsp5 (Soetens et al., 2001) promoviendo la degradación de Gap1 por endocitosis hasta la vacuola. Además, se ha demostrado que Bul1 y Bul2 regulan los niveles de expresión de otras permeasas como Ctr1 (Liu et al., 2007) y Fur4 (Nikko & Pelham, 2009) a través de Rsp5.



En *S. cerevisiae*, se ha identificado otro miembro de la familia de proteínas Bul, Bul3 (Sullivan et al., 2012). Las funciones de esta proteína permanecen sin resolver, aunque parece estar implicada, al igual que sus homólogos, en la reordenación de proteínas de membrana mediada por ubiquitina. El descubrimiento de esta nueva proteína anima a la identificación de ésta en el genoma de *H. polymorpha*. A pesar de que esta familia de proteínas parece cumplir algunas funciones comunes, Sullivan y colaboradores han demostrado que también pueden funcionar antagónicamente.

La delección de *BUL1* incrementa la resistencia de las células de levadura al antibiótico fleomicina, implicado en el daño al ADN, sin embargo, la delección de *BUL2*, *BUL3* o ambos vuelve a la célula sensible al daño del ADN, mientras que el triple mutante $\Delta bul1\Delta bul2\Delta bul3$ crece de forma similar a la cepa silvestre, indicando que la sensibilidad a fleomicina causada por la mutación de *BUL2*, *BUL3* o la doble mutación de estos genes es compensada por la mutación de *BUL1*. Es por ello, que la identificación y el estudio de la función de Bul3 en la regulación de Ynt1 es un aspecto interesante para ser estudiado.

Nuestros resultados muestran que la obtención de una cepa delecionada en el gen 14-3-3 e interrumpida con el marcador *URA3* no ha sido posible. Un análisis más exhaustivo se precisa para la obtención de dicha cepa. Una de nuestras metas, paralela a la obtención de la cepa de *H. polymorpha* con el gen de 14-3-3 delecionado, fue ver las posibles consecuencias fenotípicas de esta mutación. Se ha comprobado que la delección de *BMH1* o *BMH2*, homólogos de 14-3-3 en *S. cerevisiae*, provoca una disminución en la tasa de crecimiento, mientras que la doble interrupción es letal para la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* (Van Heusden et al., 1995). En este trabajo se han observado diferencias en el tamaño de las colonias tras la transformación de células competentes de *H. polymorpha*, sin embargo, la re- siembra de estas colonias no muestra diferencias en el tamaño de las colonias (datos no mostrados). Esto podría explicarse si la sustitución de la copia genómica por la copia delecionada no hubiese sido eficaz o si la interrupción de 14-3-3 en *H. polymorpha* no tuviera efecto sobre la tasa de crecimiento.

En las levaduras convencionales *S. cerevisiae* y *S. pombe*, así como para *Yarrowia lipolytica*, existen dos isoformas de 14-3-3. Sin embargo, la levadura *Candida albicans* únicamente presenta una isoforma. Esta diferencia en cuanto al número de isoformas podrían deberse a que no se han encontrado otras isoformas en aquellas levaduras que solo presentan una o simplemente que existe una expresión diferencial en el número de isoformas en levaduras. En el genoma de *H. polymorpha* solo se ha encontrado una isoforma, por lo que la

búsqueda de nuevas isoformas de 14-3-3 en esta levadura y en *C. albicans* será clave para elucidar esta expresión diferencial de isoformas. Además esta búsqueda en *H. polymorpha* se vuelve más relevante para el estudio de la letalidad de las mutaciones de 14-3-3. La determinación de la letalidad de estas mutaciones deberá hacerse a través del uso de promotores condicionales como el de la nitrato reductasa. En presencia de fuentes no preferentes de nitrógeno, por ejemplo, nitrato, el promotor estará encendido, induciendo la expresión de los genes delecionados de 14-3-3. Posteriormente, el cultivo en medios con fuentes preferentes de nitrógeno, como el amonio, apagará el promotor de la nitrato reductasa. En este punto, si las células de levadura no crecen, podremos afirmar que las deleciones de 14-3-3 son esenciales.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado y construido el vector p Δ bul2::BLE para la interrupción del gen *BUL2*, sin embargo, los resultados sobre la verificación del vector no son concluyentes. Deberán realizarse posteriores análisis para concluir la validación del vector.
2. La obtención de cepas delecionadas en 14-3-3 en la levadura *Hansenula polymorpha* requiere de un análisis más exhaustivo. Asimismo, el estudio fenotípico de esta mutación deberá llevarse a cabo.
3. Las cepas Δ 14-3-3::URA3 (BA 001) y Δ bul2::ble (BA 002) de levadura serán usadas en el estudio de la regulación post-traducciona del transportador de nitrato y nitrito de alta afinidad Ynt1 en la levadura *Hansenula polymorpha*.

CONCLUSIONS

1. p Δ bul2::BLE vector has been design and constructed for *BUL2* gene disruption, nevertheless, vector verification results are not conclusive. Further analysis should be carry out to conclude the validation of the vector.
2. Obtaining 14-3-3 deleted strains in yeast *Hansenula polymorpha* requires further analysis. Likewise, phenotypic study of this mutation should be carry out.
3. Δ 14-3-3::URA3 (BA 001) and Δ bul2::ble (BA 002) yeast strains will be used to study post-translational regulation of high affinity nitrate/nitrite transporter Ynt1 in the yeast *Hansenula polymorpha*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, A. (2002). Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Molecular Biology*, 50(6), 993–1010. <http://doi.org/10.1023/A:1021261931561>
- Benzinger, A., Popowicz, G. M., Joy, J. K., Majumdar, S., Holak, T. a., & Hermeking, H. (2005). The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Research*, 15(4), 219–227. <http://doi.org/10.1038/sj.cr.7290290>
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <http://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Chaudhri, M., Scarabel, M., & Aitken, A. (2003). Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300, 679–685. [http://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02902-9](http://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02902-9)
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <http://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172>
- Cognetti, D., Davis, D., & Sturtevant, J. (2002). The Candida albicans 14-3-3 gene, BMH1, is essential for growth. *Yeast*, 19(1), 55–67. <http://doi.org/10.1002/yea.804>
- Comparot, S., Lingiah, G., & Martin, T. (2003). Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 595–604. <http://doi.org/10.1093/jxb/erg057>
- Dubois, T., Howell, S., Amess, B., Kerai, P., Learmonth, M., Madrazo, J., ... 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. <http://doi.org/10.1023/A:1026321813463>
- Duboist, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhussent, U., Soneji, Y., Morrice, N., ... Aitken, A. (1997). 14-3-3 Is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28882–28888. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28882>
- Fiorillo, A., di Marino, D., Bertuccini, L., Via, A., Pozio, E., Camerini, S., ... 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://doi.org/10.1371/journal.pone.0092902>
- Forde, B. G. (2000). Nitrate transporters in plants: Structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00140-1](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00140-1)
- Fu, H., Subramanian, R. R., & Masters, S. C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40, 617–647. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617>
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., & Klein, D. C. (2005). Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1222–1227. <http://doi.org/10.1073/pnas.0406871102>
- Gardino, A. K., Smerdon, S. J., & 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. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.007>

- Gellissen, G. (2002). *Hansenula polymorpha: Biology and Applications*. Wiley-VCH.
- Gu, M., & Du, X. (1998). A novel ligand-binding site in the ??-form 14-3-3 protein recognizing the platelet glycoprotein Ib?? and distinct from the c-Raf-binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33465–33471. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33465>
- Hemert, M. J. Van, Heusden, G. P. H. Van, & Steensma, H. Y. (2001). Yeast 14-3-3 proteins, 889–895.
- Hettema, E. H., Valdez-Taubas, J., & Pelham, H. R. B. (2004). Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *The EMBO Journal*, 23(6), 1279–1288. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600137>
- Hicke, L., & Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 141–172. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617>
- Hurtado, C. a R., & Rachubinski, R. a. (2002). YIBMH1 encodes a 14-3-3 protein that promotes filamentous growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology*, 148(11), 3725–3735.
- Jones, D. H., Ley, S., & Aitken, a. (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters*, 368, 55–58. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00598-4](http://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00598-4)
- Jones, D. H., Martin, H., Madrazo, J., Robinson, K. a, Nielsen, P., Roseboom, P. H., ... Aitken, a. (1995). Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 245, 375–384. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0031>
- Lin, C. H., MacGurn, J. a., Chu, T., Stefan, C. J., & Emr, S. D. (2008). Arrestin-Related Ubiquitin-Ligase Adaptors Regulate Endocytosis and Protein Turnover at the Cell Surface. *Cell*, 135(4), 714–725. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.025>
- Liu, J., Sitaram, A., & Burd, C. G. (2007). Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic*, 8(10), 1375–1384. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00616.x>
- Martín, Y., González, Y. V., Cabrera, E., Rodríguez, C., & Siverio, J. M. (2011). Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27225–27235. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.265116>
- Merhi, a., & Andre, B. (2012). Internal Amino Acids Promote Gap1 Permease Ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-Dependent Control of the Bul Arrestin-Like Adaptors. *Molecular and Cellular Biology*, 32(22), 4510–4522. <http://doi.org/10.1128/MCB.00463-12>
- Mhaweche, P. (2005). 14-3-3 Proteins--an Update. *Cell Research*, 15(4), 228–236. <http://doi.org/10.1038/sj.cr.7290291>
- Navarro, F. J., Machín, F., Martín, Y., & Siverio, J. M. (2006). Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13268–13274. <http://doi.org/10.1074/jbc.M601253200>
- Navarro, F. J., Martín, Y., & 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802170200>
- Nikko, E., & Pelham, H. R. B. (2009). Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic*, 10(12), 1856–1867. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00990.x>

- Novoselova, T. V., Zahira, K., Rose, R. S., & Sullivan, J. a. (2012). Bul proteins, a nonredundant, antagonistic family of ubiquitin ligase regulatory proteins. *Eukaryotic Cell*, *11*(4), 463–470. <http://doi.org/10.1128/EC.00009-12>
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*.
- Pérez, M. D., González, C., Avila, J., Brito, N., & Siverio, J. M. (1997). The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *The Biochemical Journal*, *321* (Pt 2, 397–403.
- Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. a., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., & Liddington, R. C. (1998). 14-3-3?? Binds a Phosphorylated Raf Peptide and an Unphosphorylated Peptide Via Its Conserved Amphiphatic Groove. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(26), 16305–16310. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16305>
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., ... Yaffe, M. B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Molecular Cell*, *4*, 153–166. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80363-9](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80363-9)
- Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R. J., Sommarin, M., & Larsson, C. (2000). Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *Journal of Molecular Evolution*, *51*, 446–458. <http://doi.org/10.1007/s002390010107>
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., & Hall, M. N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *The EMBO Journal*. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6924>
- Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., & Obsil, T. (2004). 14-3-3 Protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49113–49119. <http://doi.org/10.1074/jbc.M408671200>
- Soetens, O., De Craene, J. O., & André, B. (2001). Ubiquitin Is Required for Sorting to the Vacuole of the Yeast General Amino Acid Permease, Gap1. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(47), 43949–43957. <http://doi.org/10.1074/jbc.M102945200>
- Truong, A. B., Masters, S. C., Yang, H., & Fu, H. (2002). Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *49*(3), 321–325. <http://doi.org/10.1002/prot.10210>
- Tzivion, G., & Avruch, J. (2002). 14-3-3 Proteins: Active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 3061–3064. <http://doi.org/10.1074/jbc.R100059200>
- Tzivion, G., Gupta, V. S., Kaplun, L., & Balan, V. (2006). 14-3-3 Proteins As Potential Oncogenes. *Seminars in Cancer Biology*, *16*, 203–213. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.004>
- Tzivion, G., Luo, Z., & Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, *394*(6688), 88–92. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/27938>
- Tzivion, G., Shen, Y. H., & Zhu, J. (2001). 14-3-3 Proteins; Bringing New Definitions To Scaffolding. *Oncogene*, *20*, 6331–6338. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1204777>
- Van Heusden, G. P. H., Griffiths, D. J. F., Ford, J. C., Chin-Woeng, a. T. F. C., Schrader, P. a T., Carr, a. M., & Steensma, H. Y. (1995). The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *European Journal of Biochemistry*, *229*, 45–53. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.00451.x>

- Van Heusden, G. P. H., Van Der Zanden, a. L., Ferl, R. J., & Steensma, H. Y. (1996). Four *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast *bmh1 bmh2* double disruption. *FEBS Letters*, *391*, 252–256. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00746-6](http://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00746-6)
- Wang, H., Zhang, L., Liddington, R., & Fu, H. (1998). Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3zeta disrupt its interaction with Raf-1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(26), 16297–16304. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16297>
- Yaffe, M. B. (2002). How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*, *513*, 53–57. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03288-4](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03288-4)
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., ... Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, *91*, 961–971. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80487-0](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80487-0)