



Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas



Valencia
Spain



UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Regulación del tráfico intracelular de proteínas en levaduras: El papel de las proteína quinasas Hal4 y Hal5 en el tráfico de permeasas de nutrientes

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autora:
CECILIA PRIMO PLANTA

Directora:
LYNNE YENUSH

Valencia, septiembre 2011

*A Lynne y a mis compañeros
del labo, por toda su ayuda...*

ÍNDICE

Introducción	1
1. La homeostasis iónica	1
2. Estudio de la homeostasis de iones en <i>Saccaromyces cerevisiae</i>.....	2
3. Genes de halotolerancia: las proteínas quinasas <i>Hal4</i> y <i>Hal5</i>	3
3.1. El transporte de K+	3
3.2. Las proteínas quinasas <i>Hal4</i> y <i>Hal5</i>	5
3.3. Regulación de <i>Trk1</i> y otros transportadores	7
4. Regulación de los transportadores de la membrana plasmática	8
4.1. Regulación del tráfico de transportadores de la MP por endocitosis	8
4.2. La familia de proteínas ART en <i>S. cerevisiae</i> : Adaptadores de <i>Rsp5</i>	11
Objetivos	16
Materiales y Métodos	17
1. Cultivo y manipulación celular	17
1.1. Bacterias.....	17
1.2. Levaduras	17
1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos).....	18
2. Técnicas de transferencia génica	19
2.1. Transformación en bacteria	19
2.2. Transformación en levadura	19

3. Técnicas de manipulación genética.....	19
3.1. Extracción de plásmidos	19
3.2. Generación de plásmidos	20
3.3. Generación de la cepa mutante <i>hal4 hal5 art1</i>	20
3.4. Análisis de tétradas.....	20
4. Doble híbrido de Mup1 con sus posibles dianas	20
5. Obtención de extractos proteicos	21
5.1. Obtención de extractos proteicos de las fracciones solubles e insolubles	21
6. Análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas por Western Blot.....	21
6.1. Electroforesis de proteínas	21
6.2. Transferencia a membrana (Western Blot)	21
6.3. Tinción de membrana	22
6.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana	22
6.5. <i>Stripping</i> para nueva inmunodetección sobre membrana	23
7. Estudio de localización celular de proteínas por microscopía confocal	23
8. Otras medidas fisiológicas	23
8.1. Medida del consumo de glucosa.....	23
8.2. Medida de la producción de etanol	24
9. Tratamientos celulares	24
9.1. Ayuno de KCl y metionina y tratamiento de metionina	24
Resultados	25
1. Rastreo dirigido a identificar las dianas Hal4 y Hal5	25

2. Análisis transcriptómico del mutante <i>hal4 hal5</i>.....	25
3. Metabolismo respiratorio en el mutante <i>hal4 hal5</i>	27
4. Toma de metionina en el mutante <i>hal4 hal5</i>.....	29
4.1. Estabilidad del transportador de la membrana Mup1 en el mutante <i>hal4 hal5</i> ante un ayuno de K ⁺	30
4.2. Acumulación de Mup1 en la membrana plasmática	33
4.3. Regulación de Mup1	35
4.4. Condiciones de visualización del transportador Mup1 en mutantes BY4741.....	37
5. Estudio del triple mutante <i>hal4 hal5 art1</i>	40
Discusión	42
Conclusiones	48
Bibliografía.....	49
Anexos	56

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

Introducción:

Figura 1.1 Principales transportadores catiónicos intracelulares y de la membrana plasmática en <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	3
Figura 1.2 Vías de regulación de los transportadores catiónicos de la membrana plasmática.....	5
Figura 1.3 Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	6
Figura 1.4 Localización subcelular de los transportadores/permeasas de nutrientes en las cepas silvestre, <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i>	7
Figura 1.5 Múltiples funciones de Rsp5 en el tráfico de proteínas.....	9
Figura 1.6 Miembros de la familia de proteínas ART en levadura.....	12
Figura 1.7 Endocitosis de cargos por los ARTs.....	13
Figura 1.8 Resumen de las funciones de las arrestinas.....	14

Materiales y Métodos:

Tabla 3.1 Cepas de <i>Saccaromyces cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo.....	18
Tabla 3.2 Anticuerpos empleados en este trabajo.....	23

Resultados:

Tabla 4.1 Resumen de las categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en el mutante <i>hal4 hal5</i>	26
Figura 4.1 Cambios en el metabolismo respiratorio en el mutante <i>hal4 hal5</i>	28
Figura 4.2 Cambios en el metabolismo respiratorio: producción de etanol.....	28
Figura 4.3 Toma de metionina en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i>	29
Figura 4.4 Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i>	31
Figura 4.5 Análisis Western de la proteína Mup1.....	32
Figura 4.6 Localización subcelular de la proteína Mup1 en la cepa silvestre.....	34
Figura 4.7 Localización subcelular de la permeasa Mup1 en la cepa mutante <i>hal4 hal5</i>	34
Figura 4.8 Análisis Western de la proteína Mup1.....	35
Figura 4.9 Ensayo de doble híbrido mediante la transformación de la cepa THY.AP4 con los plásmidos indicados.....	37
Figura 4.10 Condiciones de visualización del transportador Mup1 en el fondo genético BY4741.....	38
Figura 4.11 Acumulación del transportador Mup1 en la cepa silvestre, <i>art1</i> y <i>art2</i> del fondo genético BY4741.....	39
Figura 4.12 Análisis Western de la proteína Mup1 en la muestra fraccionada de las cepas indicadas.....	39
Figura 4.13 Localización subcelular de la proteína Mup1 en la cepa triple mutante <i>hal4 hal5 art1</i>	41

ABREVIATURAS

ARTs	<i>Arrestin-related trafficking adaptors</i>
ATP	Adenosin trifosfato
DNA	Deoxyribonucleic acid(Ácido desoxirribonucleico)
DMR	Fracciones de la membrana resistentes a deterengentes
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTE	1,4-dithioerithritol
DTT	Ditiotreitól
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
GCN	<i>General Control of Nutrients</i> (contol general de nutrientes)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activadapor mitógeno)
MAST	<i>Motif Alignment and Search Tool</i> , Herramienta de alineamiento y búsqueda de motivos
MPM	Membrana-poro-membrana
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
Pons	PonceauS
PY domain	Dominio Prolina-Tirosina
SCD	<i>Synthetic Complete Drop-out</i> , Medio mínimo completo
SD	Medio mínimo sintético
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis engelde poliacrilamida-dodecil sulfato sódico)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i> (base de datos del genoma de Saccharomyces)
TBS	<i>Tris-Buffered-Salin</i>
TEMED	N,N,N,N,'-tetrametilnediamina
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose</i> , Medio rico
WT	<i>Wild type</i> , cepa silvestre

Introducción

INTRODUCCION

1. La homeostasis iónica

Los cationes monovalentes y divalentes como protones, potasio, sodio, calcio y magnesio juegan papeles fundamentales en el interior celular. Por tanto, la regulación de las concentraciones de iones intracelulares es una propiedad esencial de los seres vivos, debiendo mantenerse dentro de un rango para evitar sus efectos tóxicos. En general en las plantas y hongos, y con excepción de algunos organismos halofíticos, este rango consiste en concentraciones relativamente altas de potasio (10^{-1} M) y sodio (10^{-2} M), y concentraciones relativamente bajas de, magnesio (10^{-3} M), protones (10^{-7} M) y calcio (10^{-7} M) (Serrano *et al.*, 1999). En un contexto fisiológico de estos organismos, se hizo obvio muy pronto que mientras que el potasio, acumulado en una relativa gran cantidad en distintos tipos celulares, resulta imprescindible en muchas funciones fisiológicas, el sodio acumulado en altas concentraciones es un catión tóxico. Este efecto tóxico es tanto por el estrés osmótico que proporciona como por un efecto tóxico del catión en sí. Por ejemplo, el sodio, y el litio, acumulados en concentraciones mayores en el citosol pueden inhibir la actividad enzimática de la familia de fosfatasa Hal2, lo cual impide la síntesis de metionina y el consiguiente acumulo de un compuesto metabólico tóxico (Murguía *et al.*, 1995; Murguía *et al.*, 1996).

El mantenimiento de las concentraciones iónicas internas viene regulado por vías homeostáticas muy complejas donde los transportadores de iones juegan un papel esencial en la entrada y salida de cationes. Estos transportadores han sido identificados a nivel molecular, y se ocupan de mantener las concentraciones de iones dentro de un rango óptimo para los sistemas celulares, sin embargo, las vías de transducción de señales que regulan su actividad y determinan la homeostasis de iones intracelulares, todavía están siendo caracterizados.

Los circuitos reguladores del transporte de iones poseen varios componentes que responden a diferentes estímulos y que operan a través de múltiples vías de transducción de señales. Se postula que las señales que desencadenan respuestas adaptativas, incluyen cambios en el turgor detectado por proteínas de membrana y cambios en las concentraciones intracelulares de cationes como potasio, sodio y calcio, detectados por proteínas citosólicas (Serrano, 1996). Como hemos visto hasta ahora, a pesar de que el conocimiento sobre las vías de señalización de la homeostasis iónica en células eucarióticas es muy limitado, no es el caso para algunas de las componentes de dicha señalización. Por ejemplo, se han identificado los canales activados por estiramiento (Gustin *et al.*, 1988; Kwon and Handler, 1995) los transductores de señal de dos componentes sensible al estrés osmótico (Wurgler-Murphy and Saito, 1997; Wurgler-Murphy and Saito, 1997), las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) ante estímulo de estrés osmótico, las proteínas quinasas generales como la proteína quinasa A (Marquez and Serrano, 1996), y la proteína fosfatasa calcineurina activada por calcio (Matheos *et al.*, 1997a; Mendizabal *et al.*, 1998). Además, los posibles factores encargados de la modulación de los transportadores de iones pueden incluir aquellos que actúan durante el crecimiento celular y el ciclo de división (Posas *et al.*, 1995), durante los cambios metabólicos (Alepuz *et al.*, 1997; Proft and Serrano, 1999) y en las respuestas generales al estrés (Siderius and Mager, 1997).

Pese a todo ello, un mejor entendimiento de los transportadores de iones y su regulación tendría un considerable valor práctico. Por ejemplo, en agricultura, el conocimiento de las proteínas implicadas

en la homeostasis de iones podría permitir generar plantas de cultivo más tolerantes a la salinidad, por medio de técnicas de ingeniería genética (Serrano, 1996).

2. Estudio de la homeostasis de iones en *Saccharomyces cerevisiae*

Entre los distintos tipos de organismos celulares existentes, las células de levadura se convirtieron en un modelo ideal para estudiar la homeostasis de iones, hace más de 50 años. La razón para utilizar *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo de células eucarióticas fueron las que se describen a continuación: la disponibilidad de la secuencia del genoma completa (la primera de las células eucarióticas) (Goffeau *et al.*, 1996), la predicción integral *in silico* de todos los transportadores (Nelissen *et al.*, 1997), así como su rápido crecimiento y la disponibilidad de herramientas genéticas para generar mutantes. Cabe destacar también que muchos de los avances en la identificación de transportadores de iones, así como de sus reguladores, provienen de estudios genéticos sobre la tolerancia salina de la levadura *S. cerevisiae*, (Serrano, 1996).

En este organismo, la ATPasa de protones de la membrana plasmática, que está codificada por el gen esencial *PMA1*, genera un gradiente electroquímico de protones que conduce el transporte secundario de nutrientes. Esta ATPasa supone más del 50% del total de proteínas de la membrana plasmática, y su actividad está regulada por el pH y por la disponibilidad de fuentes de carbono (Serrano, 1991). Además, un incremento en la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática puede llevar a una entrada de cationes tóxicos desde el espacio extracelular al interior.

Por otro lado, la extrusión de iones tóxicos, como el sodio o el litio, en *S. cerevisiae* depende principalmente del gen *ENA1*. Este gen, es un miembro de una familia de genes repetidos en tándem que codifican para unas ATPasas de tipo P (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995). La transcripción de *ENA1*, la única repetición con alto nivel de expresión, se induce por estrés sódico (Garcíadeblas *et al.*, 1993), mediada principalmente por la vía de la proteína MAP-quinasa Hog1 (Marquez and Serrano, 1996) y la vía del Ca^{2+} -calmodulina-calcineurina (Mendoza *et al.*, 1994a; Marquez and Serrano, 1996). Esta inducción de *ENA1*, también aumenta marcadamente ante un pH alcalino (Marquez and Serrano, 1996) y viene mediada principalmente por la vía de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2002) o por la vía de Rim 101 (Lamb *et al.*, 2001). Además, por dos vías de señalización desencadenadas por el metabolismo de la glucosa (la vía de la proteína quinasa A (Marquez and Serrano, 1996) y la vía Snf1 (Alepez *et al.*, 1997)) o por la vía Ure2-Gln3 desencadenada por el metabolismo del nitrógeno (Crespo *et al.*, 2001). También se postula que la ATPasa Ena1 se regula a nivel post-traduccional por Ca^{2+} /calmodulina vía un mecanismo independiente de calcineurina (Wieland *et al.*, 1995).

Respecto a los principales transportadores de K^+ hacia el interior celular, ya han sido identificados, sin embargo sobre los mecanismos que regulan la toma de cationes en *S. cerevisiae*, hay un escaso conocimiento, y todavía han de seguirse investigando. En células de levadura, se conoce que los sistemas de transporte se dan tanto a nivel de la membrana plasmática como a nivel de la membrana de los orgánulos. Ambos median los flujos de los cationes monovalentes con diferentes especificidades de sustrato y utilizando distintos mecanismos como por ejemplo ATPasas, simporters, antiporters, y canales pasivos. También, algunas observaciones generan pistas sobre este tipo de transporte, por ejemplo, la presencia de altas concentraciones de calcio o potasio (Nakamura *et al.*, 1993) en el medio, da lugar a una mayor resistencia al estrés por litio y sodio. Se

piensa que el efecto del calcio, al menos en parte debe ser mediado por la activación de calcineurina (Matheos *et al.*, 1997), así como por un intercambio y secuestro de cationes (Cunningham and Fink, 1996). Por otro lado, los efectos benéficos del K^+ pueden ser debidos por competencia o por intercambio con otros cationes, como consecuencia de la activación de su vía de señalización. Además, se ha observado que el transporte de K^+ , participa en la tolerancia a iones (Gomez *et al.*, 1996). Por ejemplo, en un ambiente con altas concentraciones del ión sodio, las células responden gastando mucha energía acumulando la suficiente cantidad de potasio intracelular para así mantener una baja cantidad de Na^+ citosólico, que resulta tóxico para muchas enzimas.

3. Genes de halotolerancia: las proteínas quinasas Hal4 y Hal5

3.1 El transporte de K^+

En *S. cerevisiae*, el potasio es el principal catión celular y es requerido en muchas funciones fisiológicas como en la regulación del volumen celular, del pH intracelular, en el mantenimiento de un potencial estable en la membrana plasmática, la compensación de las cargas negativas en muchas macromoléculas, la síntesis proteica y la activación enzimática (Revisado en Arino *et al.*, 2010).

Para el mantenimiento de una concentración de K^+ intracelular óptima, así como un ratio K^+/Na^+ alto y estable, las células de levadura emplean tres estrategias diferentes. La primera de ellas consiste en discriminar de forma estricta la entrada de los cationes metálicos alcalinos ya que los transportadores presentar una mayor afinidad por el potasio que por el sodio. Otra estrategia celular es el conseguir una salida eficiente de cationes tóxicos presentes en las células. La tercera estrategia, y no por ello menos importante, consiste en el secuestro selectivo o compartimentación de los cationes en los distintos orgánulos celulares (Revisado en Arino *et al.*, 2010).

Sobre los sistemas de transporte específicos del catión potasio, en *S. cerevisiae* se han caracterizado varios transportadores específicos de potasio que actúan a nivel de membrana, ya sea plasmática o de algún orgánulo celular. Mediando los flujos de K^+ por distintos mecanismos.

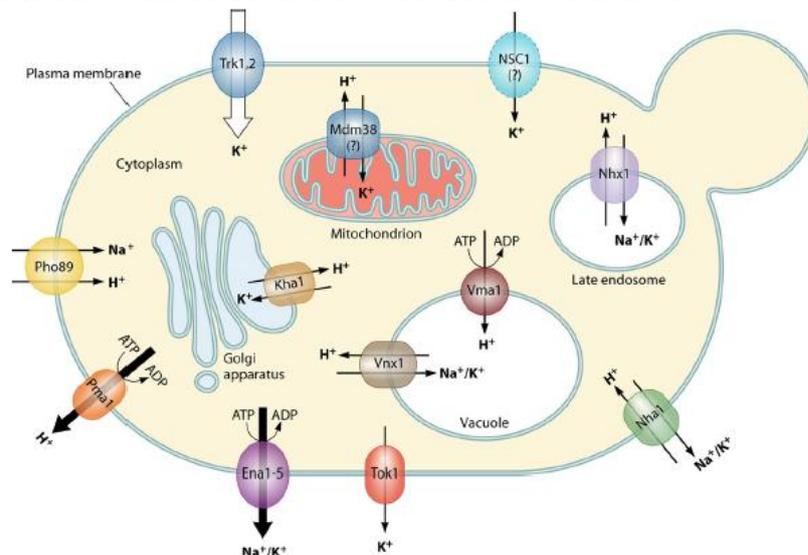


Figura 1.1. Principales transportadores catiónicos intracelulares y de la membrana plasmática en *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Ariño *et al.*, 2010.

Respecto a los transportadores de la membrana plasmática, para el caso de transporte de potasio, se ha observado que tienen varias funciones como: suministrar a las células una cantidad suficiente de potasio, mantener la homeostasis de potasio, eliminar los cationes tóxicos como sodio o litio, preservar el potencial de membrana, regular el pH intracelular, mantener un turgor positivo en el interior celulares (necesario para la membrana plasmática/expansión de la pared celular y la división celular), y combatir el estrés osmótico. Se han caracterizado al menos 6 transportadores en la membrana plasmática responsables de la realización de estas funciones descritas. Estos son el sistema de toma de potasio Trk1 y Trk2, el canal de potasio Tok1, el *simporter* Pho89 de Pi-Na⁺, el sistema de salida de K⁺/Na⁺ Ena, y el *antiporter* Na⁺/H⁺ Nha1. Además de estos seis transportadores específicos, existe un canal catiónico cuya actividad ha sido demostrada pero cuyo gen todavía permanece sin caracterizar y que es conocido como NSC1 (non-specific channel 1), y algunos otros transportadores no específicos que implican flujos marginales de potasio y sodio a través de la membrana plasmática como Pmp3 y Qdr2 (Revisado en Arino *et al.*, 2010).

Por otro lado, el transporte intracelular, comprende fundamentalmente los *antiporters* de cationes alcalinos metálicos/H⁺ de las membranas vacuolares (Vnx1), endosomales (Nhx1), y del aparato de Golgi (Kha1). También, aunque el gen no ha sido todavía descrito, existe un intercambio muy eficiente de K⁺ por H⁺ en la membrana mitocondrial. Así, de forma similar a los transportadores de la membrana, los orgánulos sirven para regular la homeostasis catiónica a nivel de citosol. Ejemplos de ello son la detoxificación del sodio por secuestro en la vacuola, el mantenimiento y regulación de homeostasis de potasio y del pH intraorgánulos, así como la modulación del tráfico de proteínas de la vía secretora.

Más concretamente, en este trabajo nos vamos a centrar en el sistema de toma de potasio de alta afinidad que se ha descrito en *S. cerevisiae* que está codificado por los genes parcialmente redundantes *TRK1* y *TRK2* (Gaber *et al.*, 1988; Ko and Gaber, 1991). Se ha observado que *TRK1* codifica para el transportador más activo, que corresponde a una proteína de 1235 aminoácidos. Además, esta posee 8 dominios trans-membrana y 4 estructuras MPM (membrana-poro-membrana) (Gaber *et al.*, 1988; Durell and Guy, 1999). Al igual que la ATPasa de protones Pma1, Trk1 es una proteína integral de la membrana plasmática, y como muchos transportadores de la membrana plasmática, se encuentra asociada a las fracciones de membrana resistentes a detergentes o fracciones DMR (*detergent-resistant membrane*) (Lauwers and Andre, 2006). Estas fracciones de membrana están enriquecidas en esfingolípidos que contienen inositol y ergosterol, el principal esteroide estructural de los hongos (Bagnat *et al.*, 2000). Se ha descrito además, que estos esfingolípidos participan en el tráfico de proteínas a la membrana plasmática (Bagnat *et al.*, 2001; Umebayashi and Nakano, 2003). Cabe destacar que la regulación de la actividad del sistema TRK afecta además de a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células (Merchan *et al.*, 2004) al potencial eléctrico de membrana (Mulet *et al.*, 1999) y al pH intracelular (Yenush *et al.*, 2002).

Estudios genéticos llevados a cabo en levadura han identificado varias proteínas implicadas en la regulación del transporte de potasio (Figura 1.2). Por ejemplo, la proteína fosfatasa Ppz1 desactiva Trk1, y es a su vez desactivada por una subunidad inhibidora, Sis2/Hal3 (de Nadal *et al.*, 1998) (Yenush *et al.*, 2002). Se ha descrito otra fosfatasa, calcineurina (Cnb1), como necesaria para la activación de Trk1 y Trk2 por estrés causado por sodio (Mendoza *et al.*, 1994). Otras proteínas

implicadas en la regulación del transporte de potasio son la proteína quinasa Sky1 (Forment *et al.*, 2002), la proteína inducida por estrés osmótico Hal1 (Rios *et al.*, 1997), la proteína G de la superfamilia Ras Arl1 (Munson *et al.*, 2004) y las proteínas quinastas Hal4 y Hal5 (Mulet *et al.*, 1999) cuya función parece estar relacionada con la regulación positiva del sistema Trk1-Trk2 y que van a ser descritas con mayor detalle a continuación.

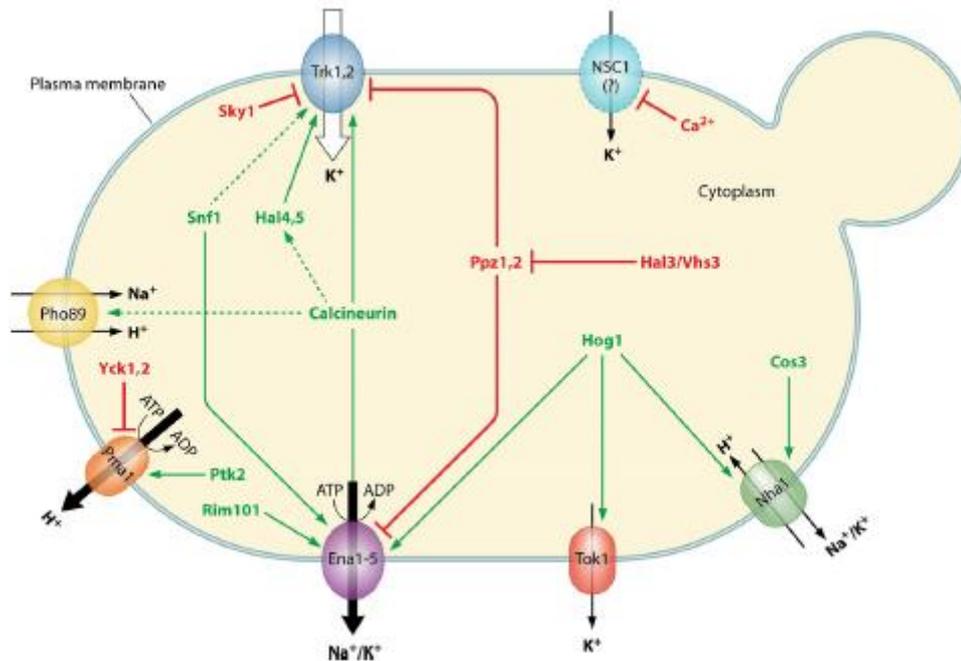


Figura 1.2. Vías de regulación de los transportadores catiónicos de la membrana plasmática. Las líneas discontinuas indican interacciones no entendidas completamente. Adaptado de Ariño *et al.*, 2010.

3.2 Las proteínas quinastas Hal4 y Hal5

Las proteínas Hal4/Sat4 y Hal5 son dos serina/treonina quinastas parcialmente redundantes que fueron identificadas por su capacidad de conferir tolerancia a salinidad (halotolerancia) por sobre-expresión en *Saccharomyces cerevisiae* (Mulet *et al.*, 1999).

Estudios genéticos sugieren que estas dos quinastas actúan regulando de forma positiva el sistema de transporte de potasio Trk1-Trk2. Esta hipótesis está basada en la observación de que la disrupción de los genes *HAL4* y *HAL5* da lugar a un fenotipo muy parecido al del mutante *trk1trk2*, y de que el mutante *hal4 hal5* requiere la adición de potasio para crecer en medio mínimo. Además, la sobre-expresión de los genes *HAL4* o *HAL5* sólo es capaz de conferir tolerancia a salinidad en cepas en las que estén presentes los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 (Mulet *et al.*, 1999)

Basándonos en la homología de secuencia de los dominios catalíticos, podemos decir que *Hal4* y *Hal5* pertenecen a la subfamilia de quinastas NRP/HAL5 (Figura 1.3). Esta subfamilia incluye también a las quinastas Npr1, Ptk1 y Ptk2, dedicadas a la regulación de transportadores de la membrana plasmática (Rubenstein and Schmidt, 2007).

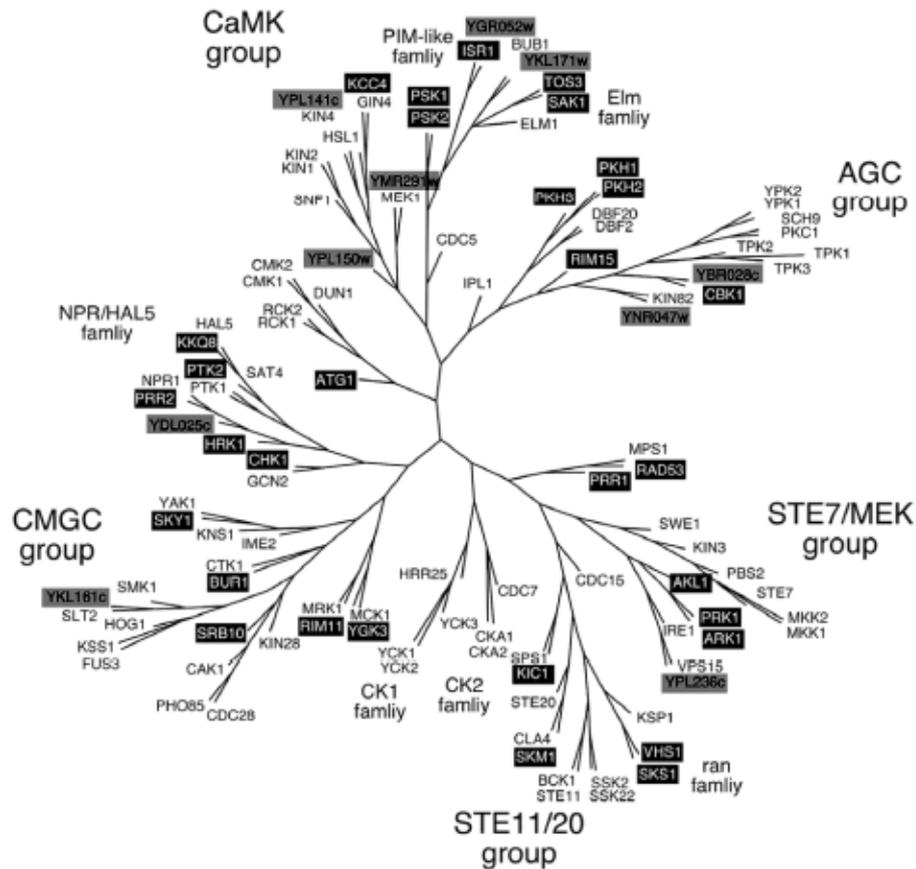


Figura 1.3. Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de *Saccharomyces cerevisiae*, adaptado de Rbenstein y Schmidt, 2007. Los principales grupos y familias de proteínas quinasas se muestran con letras más grandes. Las quinasas que se han nombrado o renombrado después de la primera aparición de este dendograma (Hunter y Plowman, 1997) se muestran con texto en blanco sobre fondo negro. Las quinasas que aún no han sido caracterizadas se muestran con texto sobre fondo gris.

Por ejemplo, se ha comprobado que la quinasa Ptk2 es necesaria para que se produzca la fosforilación de Pma1, pero no se han podido encontrar evidencias de una fosforilación directa (Eraso *et al.*, 2006). Además, debido a la hiperpolarización de la membrana plasmática producida por la disrupción de *PTK2*, el mutante es sensible a varios cationes tóxicos, incluyendo litio, sodio, higromicina B, manganeso, tetrametilamonio y poliaminas (Goossens *et al.*, 2000).

Respecto a la quinasa Npr1, esta participa en la regulación de permeasas de aminoácidos sensibles a amonio (Vandenbol *et al.*, 1990), controla el tráfico biosintético y endocítico de la permeasa de aminoácidos Gap1 (De Craene *et al.*, 2001), afecta al tráfico y a la estabilidad en la membrana plasmática de la permeasa de triptófano Tat2 (Beck *et al.*, 1999), y participa en la regulación del factor de transcripción Gln3 (Tate *et al.*, 2006), aunque tampoco se tienen evidencias de fosforilación directa de estas proteínas.

El resto de proteínas quinasas de este grupo tiene otras funciones que, en principio, no están relacionadas con la regulación de transportadores de la membrana plasmática. La quinasa Gcn2 juega un importante papel en la ruta de respuesta al ayuno de aminoácidos (ruta GCN). La fosforilación del factor de iniciación 2 (eIF2) por Gcn2 conduce a un aumento en la expresión del

factor de transcripción Gcn4, necesario para la inducción de los genes de biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 2005).

3.3 Regulación de Trk1 y otros transportadores

A pesar del intenso trabajo realizado por algunos laboratorios, el conocimiento sobre la regulación post-transcripcional de Trk1 y Trk2, es todavía limitado. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el laboratorio de Serrano identificó los genes que codifican para las proteínas quinasas *HAL4/SAT4* y *HAL5* como genes capaces de conferir tolerancia a cationes tóxicos al ser sobreexpresados en una cepa WT. La caracterización de estos dos genes reveló que eran activadores parcialmente redundantes del transporte de potasio que actuaban modulando positivamente Trk1 y Trk2 (Mulet et al, 1999). Ello generó la hipótesis de que el sistema Trk1 pudiera ser controlado directamente por eventos de fosforilación, pero un trabajo más reciente ha demostrado que Hal4 y Hal5 son requeridos para la estabilización de Trk1 en la membrana plasmática bajo condiciones de baja concentración de potasio previniendo así su endocitosis y posterior degradación vacuolar (Perez-Valle et al., 2007). Por otro lado, se ha visto que el papel de estas quinasas no está restringido al transportador Trk1, ya que se ha encontrado que algunos transportadores de nutrientes como las permeasas Can1, Fur4, y Hxt1, aparecen desestabilizadas en el doble mutante *hal4 hal5*, bajo condiciones de baja concentración de potasio en el medio. Estos datos son consistentes con un nuevo mecanismo de regulación de un conjunto de transportadores influenciados tanto por las proteínas quinasas como los niveles intracelulares de K^+ . Sin embargo el mecanismo molecular responsable de este modo de regulación se encuentra todavía sin caracterizar.

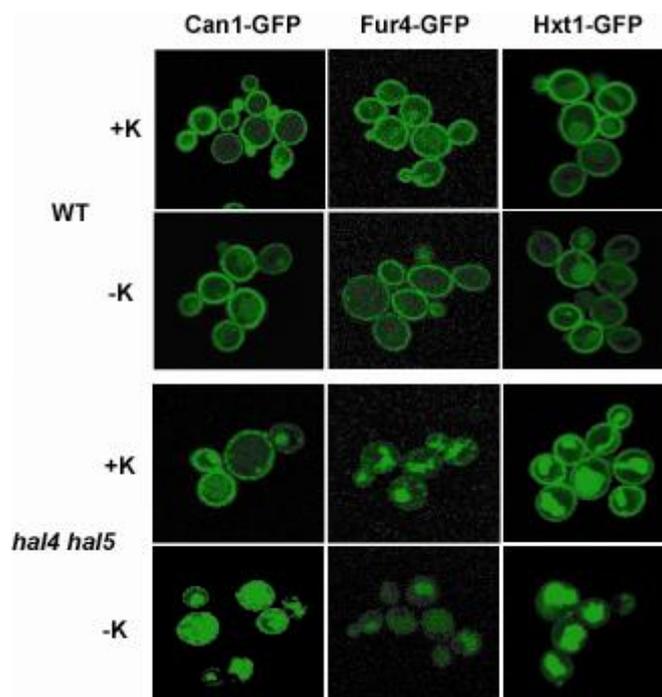


Figura 1.4. Localización subcelular de permeasas de nutrientes en las cepas silvestre, *hal4hal5* y *trk1trk2*. Adaptado de Perez-Valle et al, 2007. Las cepas indicadas fueron transformadas con plásmidos que expresan fusiones de GFP con las proteínas Can1, Fur4 y Hxt1, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio, incubadas en medio sin o con suplemento de potasio durante 2 horas y analizadas por microscopía confocal. Se han mostrado las imágenes más representativas de cada situación.

4. Regulación de los transportadores de la MP

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se han identificado 282 transportadores transmembranales, de los cuales, 125 se sabe que están localizados en la membrana plasmática (Van and Andre, 2001). Algunos de estos transportadores, como la ATPasa de protones Pma1, son esenciales en todas las condiciones de crecimiento. Tales proteínas están siendo continuamente sintetizadas y están presentes en una forma activa y estable en la superficie celular. Hay evidencias crecientes acerca de que estos transportadores “constitutivos” son sólo una pequeña fracción de todos los transportadores de levadura. De hecho, el número de transportadores que se ha observado están rigurosamente regulados por las condiciones ambientales está aumentando. Los mecanismos por los cuales las células controlan los transportadores actúan esencialmente a tres niveles: transcripción génica, tráfico intracelular de proteínas sintetizadas, y modulación de la actividad intrínseca. Puesto que los mismos principios parecen gobernar la regulación de los transportadores en las células de plantas y animales, la levadura constituye un modelo adecuado para el estudio detallado de estos mecanismos.

En los últimos quince años, un gran número de estudios se han centrado en la regulación de los transportadores de levadura a nivel de tráfico a la membrana. Al menos, tres formas de control se han descrito hasta la fecha. Una forma generalizada y eficaz de eliminar un transportador consiste en desencadenar su incorporación específica en las vesículas endocíticas y así marcar esta proteína internalizada para su degradación vacuolar/endosomal. Por otro lado, el destino de un transportador recientemente sintetizado dentro de la vía secretora también es regulado frecuentemente de forma que la proteína será marcada para incorporarse en la superficie celular o en la vacuola, pero sin pasar a través de la membrana plasmática. En tercer lugar, algunos transportadores son almacenados en membranas intracelulares y reciclados a la membrana plasmática en respuesta a señales específicas. Algunas situaciones fisiológicas típicas que inducen estos mecanismos de control son cambios en la concentración de los sustratos, la disponibilidad de nutrientes alternativos, y varios estreses ambientales.

4.1 Regulación del tráfico de transportadores de la MP por endocitosis

Un mecanismo clave para el control de la composición proteica y su organización en la membrana plasmática es la endocitosis. En este proceso, las proteínas integrales de la membrana plasmática son marcadas por ubiquitinación, la cual origina su internalización por endocitosis, de forma que los *cargos* se incorporan a los cuerpos multivesiculares (MVB) para ser liberados en la vacuola en hongos y plantas, y en los lisosomas en células de mamífero.

La ubiquitinación, es una modificación post-traducciona en la cual un polipéptido de 76 aminoácidos conocido como ubiquitina (Ub) se une covalentemente al grupo ϵ -amino del residuo de lisina en las proteínas dianas. Existen diversas formas de modificaciones de ubiquitina: la monoubiquitinación, es la unión de una única ubiquitina a una proteína; por otro lado la multiubiquitinación tiene lugar cuando algunos residuos de lisina de la proteína diana son marcados con moléculas de ubiquitina individuales, y la poliubiquitinación implica la adición de una cadena de ubiquitinas que están unidas por el residuo C-terminal de glicina de la primera ubiquitina y un residuo específico de lisina interno, de las ubiquitinas en la cadena. Se ha observado que la monoubiquitinación o la multiubiquitinación son necesarias para la entrada de ciertos *cargos* en las vesículas en distintos estados de la vía

secretora/endocítica (Hicke, 2001), mientras que la poliubiquitinación ha sido principalmente asociada con la degradación proteosomal, aunque ciertamente tiene una función más amplia (Pickart and Fushman, 2004). En el caso de la poliubiquitinación puede haber al menos siete uniones diferentes entre ubiquitinas ya que hay siete residuos de lisina diferentes en la ubiquitina. El papel de las diferentes uniones en las poliubiquitinas ha comenzado a elucidarse en los últimos años. La unión a través de la lisina 48 (Ub⁴⁸) está implicada principalmente en el direccionamiento hacia el proteosoma, y la unión con la lisina 63 (Ub⁶³) parece jugar un papel importante en el control de la calidad del DNA, respuesta inflamatoria, vía endocítica y síntesis proteica ribosomal (Pickart and Fushman, 2004a)

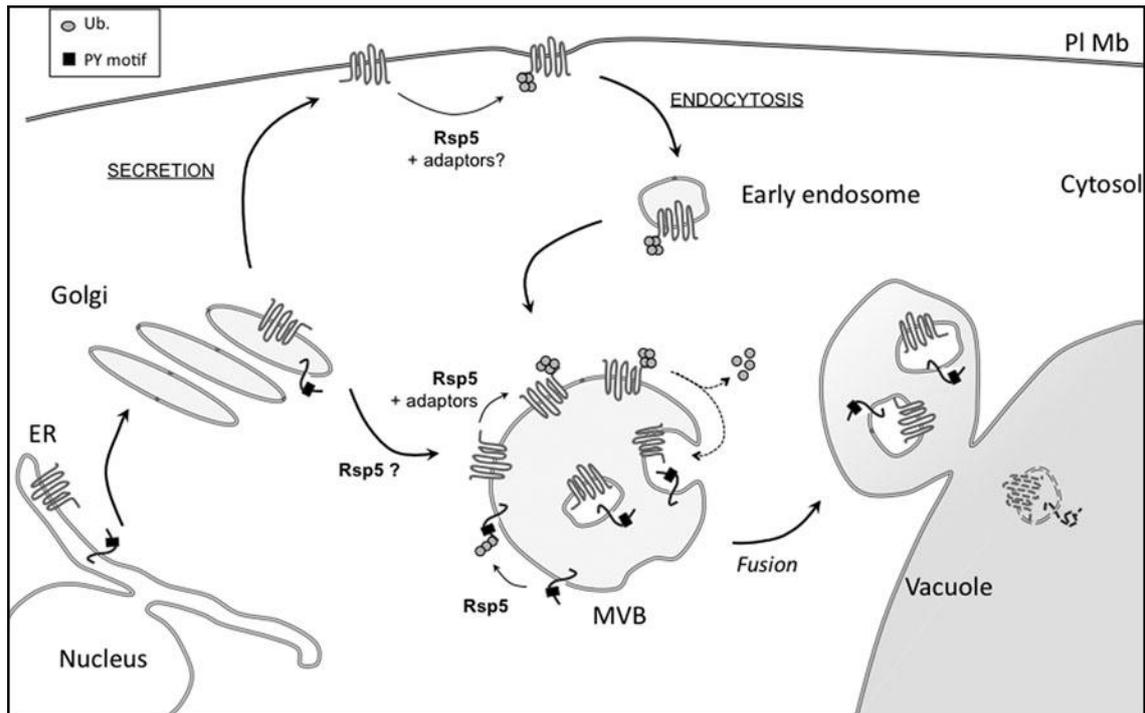


Figura 1.5. Múltiples funciones de Rsp5 en el tráfico de proteínas. Figura adaptada de Belgareh-Touzé, 2008. Transportadores multifuncionales son enviados a la membrana plasmática tras ser fosforilados (no mostrado). Una vez en la membrana son ubiquitinados por Rsp5 (Ub⁶³), lo cual desencadena su internalización. El mismo transportador puede ser directamente enviado a la vía endosomal y por tanto a la vía VPS (*vacuolar protein sorting*). Esta vía puede ser usada por distintas proteínas, como las proteínas con motivos PY (rectángulo negro). Ambas proteínas son ubiquitinadas por Rsp5 lo cual las dirige desde el aparato de Golgi al endosoma. Mientras que los transportadores muestran una ubiquitinación dependiente del adaptador en los MVB, las proteínas con motivos PY interactúan directamente con Rsp5, originando su ubiquitinación (cadenas Ub⁶³). Las proteínas ubiquitinadas originarias del aparato de golgi o de la membrana plasmática son primero deubiquitinadas antes de internalizarse en las vesículas MVB. Tras la fusión de los MVB con la vacuola, estas proteínas son degradadas por proteasa vacuolares.

La ubiquitinación, como ya se ha comentado, también funciona como señal de clasificación en el endosoma dirigiendo de este modo sus sustratos al interior de los cuerpos multivesiculares (MVB) (Komada and Kitamura, 2005), el cual es el primer paso de su transporte a la vacuola. Cabe destacar que esta vía no es única para la represión de los receptores de la membrana plasmática, y que la mayoría de proteínas que no están ubiquitinadas siguen otras vías, donde esas proteínas son recicladas de los endosomas hacia otros compartimentos celulares. La internalización tiene lugar tras la inclusión del *cargo* en las vesículas endocíticas que comienzan a invaginar. Tras su internalización, todos los *cargos* de la membrana plasmática que han sido ubiquitinados son transportados a través de vesículas que se forman en el lumen de algunos intermediarios endocíticos conocidos como endosomas tempranos (o endosomas post-Golgi, PGE) y tardíos (o endosomas pre-

vacuolares). En estos últimos, se originan los cuerpos multivesiculares, que son el producto vesicular maduro. Posteriormente, la fusión de los MVB con el lisosoma/vacuola resulta en la liberación de estas vesículas internas y de sus *cargos* asociados en el lumen del lisosoma/vacuola, donde son degradados por las proteasas vacuolares y las lipasas (Lauwers *et al.*, 2010).

La entrada del transportador en la ruta del cuerpo multivesicular requiere el marcaje del *cargo* con la ubiquitina, y es mediada por el complejo ESCRT o Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte. Esta maquinaria está compuesta por cinco complejos multi-subunidad denominados ESCRT-0, -I, -II, -III y Vsp4-Vta1 (Hurley and Emr, 2006).. Al menos un componente de cada uno de los complejos ESCRT-0, -I y -II contiene un dominio de unión a ubiquitina con lo que esos complejos funcionarían de manera cooperativa dirigiendo a los *cargos* ubiquitinados hacia los cuerpos multivesiculares (Shields *et al.*, 2009).

Uno de los mayores avances realizados en el entendimiento del proceso de endocitosis de los transportadores fue el descubrimiento del rol jugado por la ubiquitina, así como la identificación de la ubiquitin ligasa Rsp5, como un elemento clave en este procesos en particular (Rotin *et al.*, 2000).

Rsp5 y su homólogo en mamíferos, Nedd4, pertenecen a una subfamilia de ligasas con dominios HECT que poseen un dominio C2, seguido de entre dos a cuatro dominios WW en su región N-terminal. Los dominios WW, son módulos de interacciones proteína-proteína de 40 aminoácidos, y que pueden ser calificados en cuatro subtipos en función de la especificidad de la unión. Experimentos de doble híbrido indicaron que los dominios WW de Rsp5 y Nedd4 son dominios WW del grupo I, ya que se unen a motivos PPxY que consisten en dos prolinas adyacentes seguidas por cualquier aminoácido y luego una tirosina (Rotin *et al.*, 2000). Rsp5 es el único miembro de esta familia de proteínas en *S. cerevisiae*, que también tiene funciones diferentes a la endocitosis, como por ejemplo la exportación del mRNA (Rodríguez *et al.*, 2003), o el procesamiento de factores de transcripción (Hoppe *et al.*, 2000). Aunque en este trabajo nos vamos a centrar en su papel en el tráfico de transportadores.

Respecto al mecanismo implicado en la ubiquitinación de los transportadores de la membrana plasmática, poco se sabe acerca de los motivos estructurales que median el reconocimiento de los distintos sustratos (incluyendo a los transportadores) por su específica ubiquitin ligasa. La interacción debe ser directa o mediada por proteínas accesorias, ya que se ha observado que los dominios WW de Rsp5 interactúan con ciertos sustratos solubles de una forma dependiente de PPxY (Wang *et al.*, 1999). Sin embargo, la mayoría de los sustratos de la membrana plasmática de Rsp5 no poseen motivos PPxY que permiten la interacción directa con los dominios WW de Rsp5. Es por ello, que se sugirió o bien la existencia de motivos actualmente desconocidos que están implicados en la interacción de Rsp5 vía sus dominios WW; o por otro lado que Rsp5 pueda interactuar con sus sustratos de la membrana plasmática por la asistencia de adaptadores.

Las proteínas Bul son adaptadores candidatos para la proteína de levadura Rsp5. Se observó que Bul1 interacciona físicamente con Rsp5 por medio de sus motivos PPxY, y Bul2 es su homólogo (Yashiroda *et al.*, 1996; Yashiroda *et al.*, 1998). Otras evidencias de ello se obtuvieron tras la delección de los genes *BUL1* y *BUL2* que perjudica la ubiquitinación y la represión de algunos transportadores de la membrana plasmática como Gap1 (Soetens *et al.*, 2001). Es por ello que se pudo concluir que las proteínas Bul son necesarias en el reconocimiento de algunos sustratos de Rsp5. Sin embargo, no pareció muy claro que estas proteínas estuvieran involucradas en el proceso de ubiquitinación y

endocitosis de todos los sustratos de Rsp5, ya que por otro lado también se observó que la delección de *BUL2* protegía el transportador Tat2 de la endocitosis, mientras que sólo la delección de *BUL1* no lo hacía; y por otro lado la endocitosis de Tat1 no se evitaba con la delección de ninguno de estos dos genes (Abe and Iida, 2003).

Pese a que sólo unos pocos adaptadores de Rsp5 se conocían hasta el momento (Bul1/Bul2, Bsd2/Tre1/Tre2, Ear1/Ssh4) (Belgareh-Touze *et al.*, 2008), los datos apuntaban que no debían ser los únicos. En el año 2008, se descubrió una familia de proteínas supuestamente dotada de una propiedad específica adaptadora demostrando que el mecanismo adaptador es mucho más amplio de lo que previamente se pensaba. Lin *et al.* (2008) identificaron una familia de proteínas que denominaron como Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina o ARTs que median la interacción entre la ubiquitin ligasa Rsp5 y los cargos durante la endocitosis en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 La familia de proteínas ART en *S. cerevisiae*: Adaptadores de Rsp5.

Art1 fue el primer miembro de la familia de Adaptadores del Tráfico Relacionados con Arrestinas o ARTs, identificado como un regulador de la endocitosis específica de *cargos* de la membrana. Todos estos datos condujeron a la hipótesis de que el genoma de levadura debía codificar otras proteínas similares que regularan también la endocitosis de *cargos* específicos.

Usando la herramienta de búsqueda y alineamiento de motivos (MAST), se identificaron ocho proteínas más, además de Art1, que a pesar de no mostrar una fuerte homología de secuencia respecto a las arrestinas, contenían dicho motivo, que se denominó motivo de arrestina. Se observó además que estas nueve secuencias poseían una longitud comprendida entre los 500 y 1200 aminoácidos, y en todas ellas, excepto para Art2 y Art8, se predijo la presencia de un dominio de plegamiento o *fold* de tipo arrestina en la parte N-terminal. Además cada una de las secuencias contenían motivos PY en su extremo C-terminal, sugiriendo que pueden actuar como adaptadores de la ubiquitin ligasa Rsp5 (Lin *et al.*, 2008).

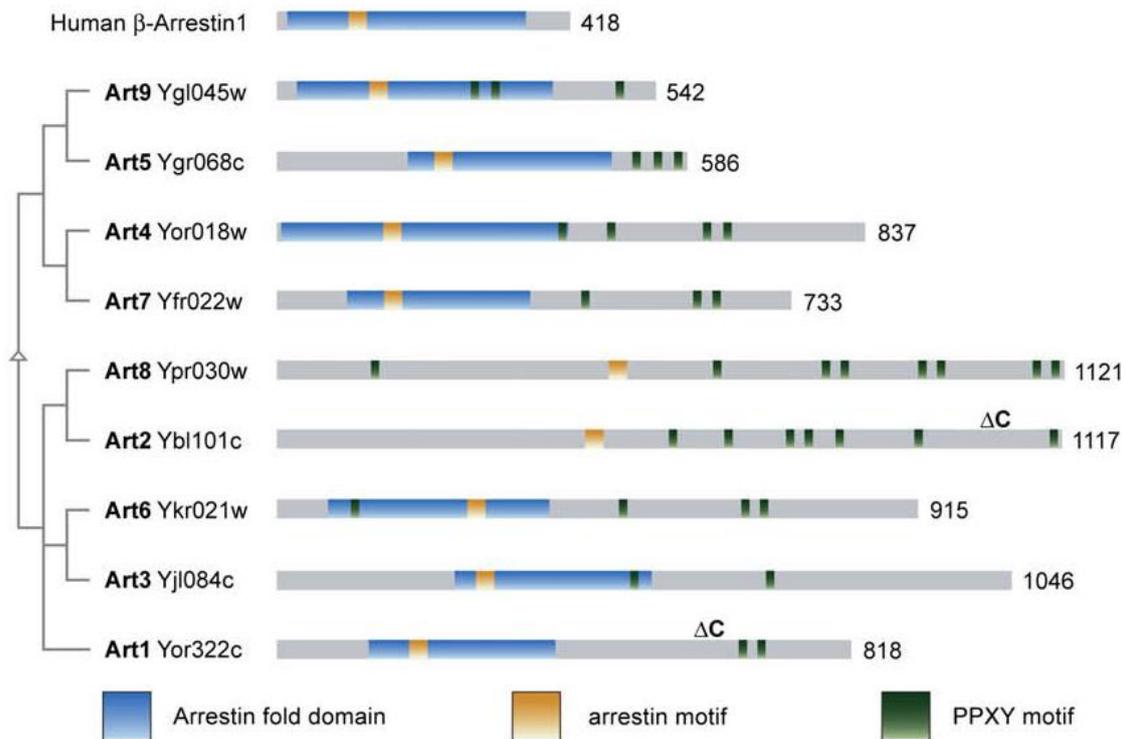


Figura 1.6. Miembros de la familia de proteínas ART en levadura. Adaptado de Lin *et al.*, 2008.

Se ha ilustrado el motivo de arrestina, el dominio de plegamiento de arrestina en la zona N-terminal y los motivos PY. EL árbol muestra la relación entre los ARTs basada en la similitud de su secuencia.

Más tarde, se comprobó que todas las proteínas ART, exceptuando Art9, tenían cierta capacidad para unirse a los dominios WW de Rsp5 en el abordaje experimental empleado. En previos estudios proteómicos a gran escala se había descrito que todos los ARTs, excepto Art5 y Art9, co-purificaban con Rsp5 a partir de extractos celulares de levadura (Andoh *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006). Por tanto todos estos datos sugieren que otros miembros de la familia Art, así como Art1, podrían regular la endocitosis al reclutar proteínas específicas de la membrana plasmática por medio de la ubiquitin ligasa Rsp5, en respuesta a diferentes estímulos.

Se llamó a esta familia, familia de Adaptadores de Tráfico Relacionados con arrestina o ARTs por su organización similar de ciertos dominios, además de por su capacidad de unirse a Rsp5. Las similitudes tanto estructurales como funcionales descubiertas en estas proteínas respecto a las arrestinas de eucariotas superiores, sugieren que la familia de proteínas ART podría funcionar como sistema de control de calidad en la membrana plasmática, marcando las proteínas para su posterior degradación en la vacuola. Así, los ARTs podrían participar en la remodelación de las proteínas de la superficie celular en respuesta a cambios ambientales (Lin *et al.*, 2008).

Respecto al funcionamiento de los ARTs, se han planteado distintas posibilidades. Aunque la más aceptada hasta el momento es que estos simplemente proporcionen una unión física entre Rsp5 y su *cargo*. Lin y sus colaboradores demostraron que Art1 es necesario para la endocitosis del transportador de metionina Mup1 y del transportador de Arginina Can1. En el caso de Mup1 observaron que la interacción entre Mup1 y Art1 era dependiente de metionina. En el caso de Can1, observaron que Art1 se relocaliza en la membrana plasmática en respuesta a señales ambientales que causan la endocitosis y degradación de esta permeasa. Concluyeron así que Art1 puede mediar la asociación de Rsp5 con los *cargos* de la membrana plasmática a través de sus motivos PY, aunque no comprobaron si Art1 es necesario para dirigir a Rsp5 hacia la membrana plasmática (Lin *et al.*, 2008). Otros estudios sí sugieren esta función para los adaptadores (Belgareh-Touze *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2010)

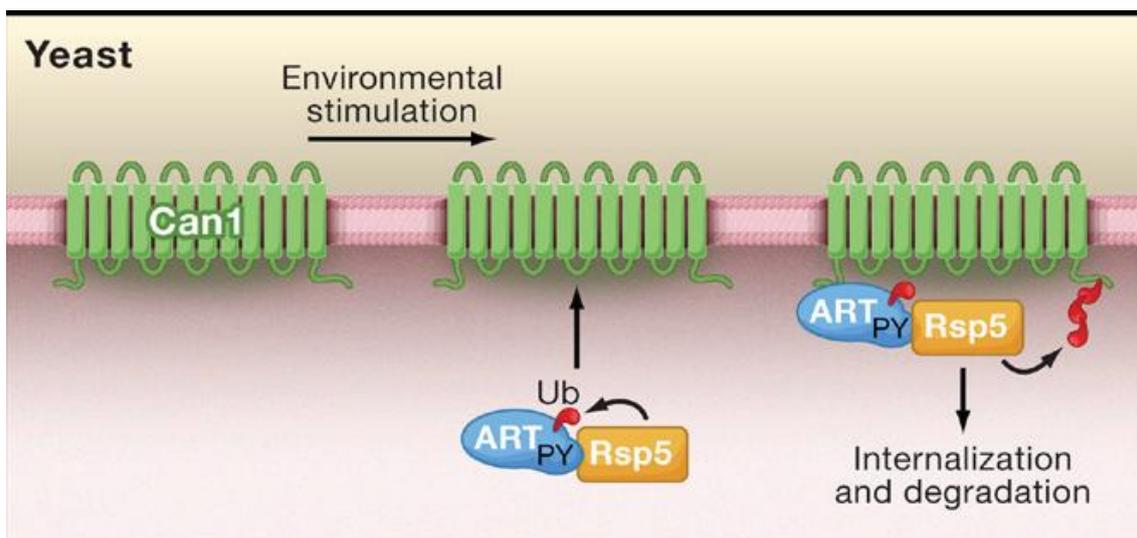


Figura 1.7. Endocitosis de *cargos* por los ARTs. Adaptado de Polo and Di Fiore, 2008.

En levadura, los Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina (ARTs) y la E3 Ubiquitin ligasa Rsp5 son reclutados en la membrana plasmática en respuesta a distintos estímulos ambientales que desencadenan la endocitosis de proteínas como permeasas y transportadores (ejemplo., el transportador de arginina Can1). A través de sus motivos PY, los ARTs se unen a Rsp5 y median la ubiquitinación (en rojo) del *cargo* (Can1). El *cargo* ubiquitinado es luego internalizado y degradado. Los ARTs son también ubiquitinados por Rsp5, evento requerido para la endocitosis.

Otro aspecto del proceso de endocitosis mediado por los ARTs que Lin y sus colaboradores (2008) desvelaron fue la necesidad de que los ARTs sean ubiquitinados por Rsp5 para poder ejercer su función. Estos investigadores observaron que la ubiquitinación del adaptador es necesaria para la correcta localización de los ARTs (Lin *et al.*, 2008). De esta forma, el hecho de que Rsp5 sea el responsable de la ubiquitinación tanto del adaptador como de su *cargo* sugiere la existencia de un bucle de retroalimentación en la endocitosis regulada por los ARTs.

Cabe destacar que la característica más importante de los ARTs es que ellos confieren especificidad a Rsp5 durante su reconocimiento del *cargo*. Art1, por ejemplo, es necesario para la endocitosis de al menos tres proteínas de la membrana plasmática, Can1, Mup1 y Lyp1, pero no de algunas otras como Fur4, Ftr1, Pdr5 y Ste2. Por otro lado, este reconocimiento del *cargo* se ha visto que depende del tipo de estímulo. Lin y colaboradores, observaron que el transportador de lisina Lyp1 requiere Art1 para su endocitosis ante un estímulo de lisina y Art2 cuando hay ciclohexamida en el medio. Ello indica que de forma poco probable ni el adaptador ni el *cargo* por sí solos determinarán la especificidad. De hecho, la especificidad debe ser mediada, al menos en parte, por la regulación de

la interacción adaptador-carga. Aunque otros mecanismos no pueden ser excluidos, modificaciones post-traduccionales específicas de los *cargos* dependientes del estímulo son los principales sospechosos de la mediación de esta regulación. De hecho, se ha observado que algunas proteínas de la membrana plasmática de levadura y mamíferos necesitan ser fosforiladas antes de que puedan ser ubiquitinadas e internalizadas (Belgareh-Touze *et al.*, 2008). Otro estudio describió que Art2 y Art8 median la ubiquitinación y endocitosis del transportador de cadmio Smf1, y que la fosforilación de este cargo es necesaria para la unión con Art2 (Nikko *et al.*, 2008). Más tarde, se demostró que la endocitosis del transportador de inositol Itr1 está mediada por Art5 y que la del transportador de hexosa de alta afinidad Hxt6 requiere de los adaptadores Art4 y Art8. En el mismo trabajo, se describe que tanto la permeasa de uracilo Fur4 como el transportador de triptófano Tat2 están regulados por diversos adaptadores entre los que se encuentran Art1, Art2 y Art8 (Nikko y Pelham, 2009). Recientemente, se ha publicado que la endocitosis de Dip5, un transportador de ácido aspártico y glutámico, se desencadena a partir del reclutamiento de Rsp5 por parte de la proteína Art3 (Hatakeyama *et al.*, 2010). Por último, se ha descrito que tanto Art3 como Art6 regulan el tráfico intracelular de proteínas como Gap1, la permeasa general de aminoácidos, mediante su asociación a proteínas señalizadoras. Así, se propone un nuevo papel para estas dos proteínas de tipo arrestina como reguladoras del tráfico intracelular independiente de endocitosis, donde el dominio de plegamiento tipo arrestina proveería de una arquitectura versátil y adaptable a diferentes funciones de tráfico (O'Donnell *et al.*, 2010).

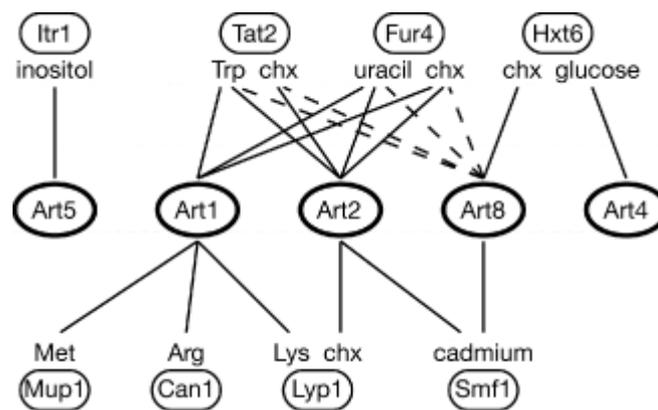


Figura 1.8 Resumen de las funciones de las arrestinas. Adaptado de Lin *et al.*, 2008

Las arrestinas se representan en la línea del centro, los transportadores en la línea superior o inferior (Lin *et al.*, 2008; Nikko *et al.*, 2008; Hatakeyama *et al.*, 2010). Las distintas sustancias empleadas para inducir la endocitosis vienen indicadas (chx, ciclohexamida). Las líneas continuas indican las funciones de una arrestina en particular con el transportador indicado y la condición inductora. Las líneas discontinuas indican una actividad débil. Todas las actividades se observaron con arrestinas expresadas bajo el control de sus propios promotores.

El reconocimiento del *cargo* también se puede ajustar finamente en múltiples niveles. Los ARTs, como se ha visto, pueden ser promiscuos, solapándose con sus *cargos*, por lo que es posible también que exista redundancia entre los adaptadores de Rsp5, como se ha visto en los pares de adaptadores Art3 y Art6 que son necesarios para la redistribución de Gap1 en la membrana plasmática en una situación limitante de nitrógeno (O'Donnell *et al.*, 2010b). También se ha visto redundancia para los pares de adaptadores de Rsp5 Tre1/Tre2, y Ear1/Ssh4 (Belgareh-Touze *et al.*, 2008). Además, se requiere cooperación entre los adaptadores, como se demostró para los adaptadores de Rsp5 Bsd2 y Tre1/Tre2 (Belgareh-Touze *et al.*, 2008e).

Esta posibilidad evoca un escenario donde la combinación de la acción de diferentes conjuntos de adaptadores sea necesaria para guiar las ubiquitin ligasas E3 hacia sus cargos específicos. Debido a que en mamíferos se ha descrito que las arrestinas de tipo α y β están ampliamente coexpresadas y en principio son capaces de heterodimerizarse, es por ello que deben funcionar de forma coordinada para ajustar finamente tanto el reconocimiento del *cargo* como el reclutamiento de la maquinaria endocítica (Alvarez, 2008). Este potencial de los adaptadores para trabajar en combinación podría resolver el interrogante de la existencia de las pocas E3 ubiquitin ligasas en relación a los sustratos ubiquitinados; hay sólo unas pocas docenas de E3s en levadura para cerca de 1000 sustratos conocidos (Peng *et al.*, 2003). La cooperación de los adaptadores con las ligasas E3 podría conferir de capacidad combinatoria suficiente para enfrentarse al gran número de sustratos. En principio 50 adaptadores podrían ocasionar más de 1200 combinaciones distintas.

Todos estos ejemplos indican que los adaptadores de E3 no son sólo los responsables del reclutamiento de sustratos específicos en una condición determinada, pero si son esenciales para su localización subcelular, disponibilidad, actividad y estabilidad de su correspondiente ubiquitin ligasa, añadiendo varios niveles de regulación al paso donde el *cargo* es ubiquitinado y puede comenzar a ser endocitado y degradado.

El entendimiento de los mecanismos por los cuales los adaptadores regulan su endocitosis así como la identificación de nuevos adaptadores sería una estrategia interesante en el combate de ciertas enfermedades, ya que se ha visto que un defecto en la endocitosis puede ser la causa de múltiples enfermedades o sensibilidades a estreses. De esta forma, estos adaptadores podrían convertirse en una buena diana terapéutica en lugar de la ubiquitin ligasa, que se sabe que tiene roles esenciales y por tanto puede ser una diana más delicada. El hecho de que este mecanismo esté muy conservado en organismos eucariotas añade importancia a esta búsqueda de conocimiento.

Datos previos del grupo indican, como ya hemos mencionado previamente, que el sistema de transporte de potasio de alta afinidad TRK, así como algunas permeasas de la membrana plasmática, están reguladas de forma positiva por las quinasas Hal4 y Hal5, necesarias para su estabilización en la membrana plasmática en condiciones de bajas concentraciones de potasio, previniendo su endocitosis y su degradación vacuolar (Perez-Valle, J. *et al.*, 2007). En este trabajo, se pretende indagar en los mecanismos de regulación de estos transportadores en ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5 y si los adaptadores de la familia ART están también implicados en dicha regulación.

Objetivos

OBJETIVOS

Los objetivos que se han propuesto para la realización de este trabajo se describen a continuación:

1. Realizar un análisis fisiológico de un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que carece de dos quinasas importantes para la halotolerancia, Hal4 y Hal5, con el fin de caracterizar su papel en la toma de nutrientes.
2. Estudiar el papel de las quinasas Hal4 y Hal5 y la posible implicación de la familia de adaptadores ARTs en el mecanismo de regulación de la permeasa de metionina de alta afinidad Mup1.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo y manipulación celular

1.1. Bacterias

Se utilizó la cepa DH5 α de *E.coli* como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. Las células bacterianas se crecieron a 37 °C en medio de Luria Bertani (LB) que contiene 0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de NaCl, y que está ajustado a pH 7 con NaOH. Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar. Cuando fue necesario para la selección de plásmidos se añadió ampicilina al medio (50 μ g/mL).

1.2. Levaduras

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se han utilizado en este trabajo se muestran en la Tabla 3.1 Las células de levadura se incubaron a 28 °C en medio YPD (2% glucosa, 2% peptona bacteriológica, 1% extracto de levadura) o en medio mínimo SD (2% glucosa, 0, 7% yeast nitrogen base, 50 mM ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris). En el caso del medio SD se añadieron aminoácidos y bases púricas y pirimidínicas de acuerdo con las necesidades de cada a cepa (30 μ g/ml adenina, 100 μ g/ml triptófano, 30 μ g /ml histidina, 10 μ g/ml leucina , 30 μ g/ml uracilo). En algunos casos los medios de YPD y SD han sido suplementados con diferentes concentraciones de sales (0.1M LiCl y 0.1M KCl respectivamente). Para los experimentos realizados a pH 4.5 se suplementó el medio YPD con 50mM de ácido succínico y se ajustó el pH a 4.5 con Tris. Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar.

Cepa	Información de la cepa	Referencia
W303-1A	W303-1A Mata <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2,3, 112 trp1-1 ura3-1</i>	Thomas & Rothstein 1989
W303 [YEp-MUP1-GFP]	W303-1A [pRS416-MUP1-GFP]	
<i>hal4hal5</i>	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pRS416-MUP1-GFP]	Mulet et al., 1999
<i>hal4hal5</i> [YEp-MUP1-GFP]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3 art1::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hal4hal5art1</i>	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3 art1::KanMX</i> [pRS416-MUP1-GFP]	
<i>hal4hal5art1</i> [YEp-MUP1-GFP]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3 art1::KanMX</i> [pRS416-MUP1-GFP]	
BY4741	Mata <i>ura3-0 leu2-0 his3-1 met15-0</i> EUROSCARF	
BY4741 [YEp-MUP1-GFP]	BY4741[pRS416-MUP1-GFP]	
<i>hal4 hal5</i>	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i>	
<i>hal4hal5</i> [YEp-MUP1-GFP]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [pRS416-MUP1-GFP]	
<i>art1</i>	BY4741 <i>art1::KanMX</i> EUROSCARF	
<i>art1</i> [YEp-MUP1-GFP]	BY4741 <i>art1::KanMX</i> [pRS416-MUP1-GFP]	
<i>art2</i>	BY4741 <i>art2::KanMX</i> EUROSCARF	
<i>art2</i> [YEp-MUP1-GFP]	BY4741 <i>art2::KanMX</i> [pRS416-MUP1-GFP]	
THY.AP4	Mata, <i>ura3, leu2,lexA::lacZ::trp1, lexA::HIS3, lexA::ADE2 2</i>	Paumi, 2007
THY.AP4 [MUP1NT-LexA][AD]	THY.AP4 [pBTM116-MUP1NT][pACT2]	
THY.AP4 [MUP1NT-LexA][ART1-AD]	THY.AP4 [pBTM116-MUP1NT][pACT2-ART1]	
THY.AP4 [MUP1NT-LexA][ART2-AD]	THY.AP4 [pBTM116-MUP1NT][pACT2-ART2]	
THY.AP4 [MUP1NT-LexA][ART4-AD]	THY.AP4 [pBTM116-MUP1NT][pACT2-ART3]	
THY.AP4 [MUP1NT-LexA][ART3-AD]	THY.AP4 [pBTM116-MUP1NT][pACT2-ART4]	

Tabla 3.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo. En la tabla se describen las cepas de levadura que han sido utilizadas a lo largo de este trabajo. Salvo que se indiquen en el campo referencia, las cepas utilizadas han sido generadas en este trabajo.

1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos)

Se realizaron diluciones seriadas de cultivos líquidos de distintas cepas de levadura crecidas hasta saturación y se depositaron aproximadamente 3 µl de cada dilución, con la ayuda de un replicador (Sigma), a placas de medio sólido con las condiciones diferenciales a estudiar. Posteriormente se incubaron las placas 2 ó 3 días a 28 °C. En el análisis del crecimiento se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de colonia.

2. Técnicas de transferencia génica

2.1. Transformaciones en bacteria

Para la transformación de bacteria se empleó un protocolo estándar de transformación por choque térmico (Hanahan, 1986). Se mezclaron entre 0.1 y 1 ng de plásmido con 100 µl de células competentes de *Escherichia coli* (cepa DH5α). Después de incubar la mezcla durante 30 minutos en hielo, se calentó a 42 °C durante 1 minuto, y seguidamente se volvió a poner en hielo. A continuación se añadieron 600 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. Por último se extendieron las células en placas de LB con antibiótico para la selección de las células transformadas.

2.2. Transformaciones en levadura

Para las transformaciones de levadura se utilizó una variación del protocolo estándar de transformación con acetato de litio. Las células de levadura (recientemente crecidas en medio YPD sólido durante 24 horas) se mezclaron con entre 0,1 y 10 µg de DNA exógeno, y se añadió 5 µl de una solución de DNA monocatenario de esperma de salmón (0.1%) y 500 µl de solución PLATE (40% PEG-4000 (p/v), 100 mM de acetato de litio (LiAc), 10 mM de Tris pH 7.5, 0.4 mM de EDTA). Después de permanecer durante un mínimo de 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla se incubó a 42 °C durante 15 minutos y se recogieron las células por centrifugación (durante 1 minuto a 13,000 r.p.m.). Finalmente, las células se resuspendieron en 200 µl de agua Mili-Q estéril y se extendieron en placas de medio selectivo.

3. Técnicas de manipulación genética.

3.1 Extracción de plásmidos

Para la extracción y purificación de plásmidos, se empleó un protocolo basado en la preparación para aislamiento de plásmidos de alta pureza de Roche Applied Science.

3.2 Generación de plásmidos

El plásmido pRS416-*MUP1-GFP* fue amablemente cedido por el profesor Scott D. Emr de la Universidad de Cornell (USA) (Teis *et al.*, 2008).

Para la generación del plásmido pBTM116-*MUP1NT* se amplificó un fragmento de PCR EcoRI/Sall correspondiente a las 180 pb del extremo N-terminal del gen *MUP1* utilizando el oligo directo -5'-**ATAGAATTC**ATGTCGGAAGGAAGAACGTT-3' y el oligo reverso 5'-**ATAGTCGAC**TTACTGCTTTTCACCTTGGTCCA-3'. Los sitios de restricción EcoRI/Sall se indican en negrita. Dicho fragmento fue subclonado en el vector multicopia pBTM116, que posee un dominio de unión al DNA, el dominio LexA y marcador de triptófano (Bartel *et al.*, 1993)

Los plásmidos pACTII-*ART1*, pACTII-*ART2*, pACTII-*ART3* y pACTII-*ART4*, se utilizaron para los ensayos de doble híbrido. Estos plásmidos derivan del vector pACTII (ClonTech), un vector que contiene el gen de selección en levaduras, *LEU2*, y contiene un dominio de activación y un epitopo HA. Para la generación de estos plásmidos se amplificaron los fragmentos de PCR (SmaI/SalI)

correspondientes a la región codificante de Art1, Art2, Art3 y Art4 (desde el codon ATG hasta el codon de parada) usando DNA genómico del fondo W303. Los fragmentos amplificados fueron subclonados en el vector pCR2.1 y en el vector pACTII (previamente digerido con los enzimas de restricción SmaI/SalI) para obtener los plásmidos de expresión de bacteria y levadura, respectivamente.

3.3 Generación de la cepa mutante *hal4 hal5 art1*

La cepa mutante *hal4 hal5 art1* se construyó de la siguiente manera. En primer lugar se hizo la disrupción de *art1* por el método de PCR-kanMX. Los oligos usados para la amplificación del *cassette* de disrupción usando como molde ADN genómico de la cepa BY7471 *art1* fueron *art1*-5'-200 TAAGGTTGATTAAGTTTGTGTGC y *art1*-3'+200 CGAAATGAAGATATTAATCCAGTC, que añaden los sitios de recombinación homóloga 200pb aguas arriba y 200pb aguas abajo del ORF delecionado. De esta forma se hizo la disrupción por recombinación homóloga del alelo completo *ART1* de la cepa haploide W303-1B.

Los transformantes fueron analizados mediante PCR genómica para comprobar si había tenido lugar la inserción en el lugar correcto del genoma por sustitución con el *cassette* kan:MX y por lo tanto, la eliminación de la secuencia elegida. Se utilizaron como oligonucleótidos *art1*-5'-250 TATCATAGGCAGTTTTTACTAGG que hibrida 250pb aguas arriba del codón de inicio del gen *ART1* y el oligonucleótido KANB-Rev-3'-350-CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT que hibrida dentro del marcador de selección Kan:MX. Si el *cassette* se ha insertado en el lugar correcto, solo se obtendrá un producto en cepas con la inserción correcta.

El triple mutante *hal4 hal5 art1* se obtuvo por cruzamiento de las cepas haploides de tipo sexual opuesto (α y a) W303-1A *hal4::LEU2 hal5::HIS3* (Mulet *et al.*, 1999) y W303-1B *art1::KanMX*. Los transformantes diploides fueron esporulados y al menos 20 tétradas fueron diseccionadas para esta transformación. La progenie haploide se cultivó en medio rico YPD.

3.4 Análisis de tétradas

El análisis de las tétradas se llevó a cabo por métodos estándar. La presencia de los *cassettes* de disrupción en la progenie haploide se evaluó por asociación de fenotipos (crecimiento en placas de YPD con 200µg/ml de geneticina y en SCD sin histidina ni leucina, suplementado con KCl 0.1M) Las esporas que se seleccionaron fueron aquellas que pudieron crecer gracias a la inserción de los marcadores de selección KanMX, *LEU2*, y *HIS3*. Las inserciones génicas se comprobaron también por PCR usando la estrategia descrito en la sección 3.3.

4. Doble Híbrido de Mup1 con sus posibles dianas

La técnica del doble híbrido es una herramienta genética para la identificación de asociaciones proteicas *in vivo* (Fields and Song, 1989). Esta técnica permite la caracterización de interacciones proteína-proteína. En este ensayo genético la interacción entre dos proteínas se mide por la reconstitución de un factor de transcripción funcional en levadura.

Se cotransformó la cepa THY.AP4 con dos quimeras, una que posee el dominio de unión al DNA (proteínas LexA) fusionada a la proteína X (plásmido pBTM116) y la otra que posee el dominio de activación (Gal4 de levadura) fusionado a la proteína Y (plásmido pACT2). Si las proteínas de fusión

interactúan, los dominios de activación y de unión se aproximan de tal forma, que pueden activar la transcripción de genes reporteros.

Para estudiar la posibilidad de interacción se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos) en las condiciones diferenciales necesarias.

5. Obtención de extractos proteicos

5.1. Obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble

Para la obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble (fraccionamiento celular) se crecieron las células hasta fase logarítmica y se recogieron 10 ml por centrifugación a 4,000 r.p.m. durante 5 minutos. A continuación se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con agua estéril.

Después se resuspendieron las células en 300 μ l de tampón de fraccionamiento (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0,1 M KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTE, 20% sacarosa, 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Roche) / 10 ml tampón) y se rompieron por agitación en presencia de bolas de vidrio de 0.5 mm de grosor. Seguidamente se añadieron 200 μ l más de tampón de fraccionamiento y se centrifugó para eliminar los restos celulares (2,000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó para separar las proteínas solubles de las insolubles (13,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C). Las proteínas de la fracción insoluble (precipitado) se resuspendieron en 50 μ l de tampón de carga Laemmli 2.5X (3.8% SDS, 0.05 M dithioeritrol, 5 mM EDTA, 15% sacarosa, 0.125 mg/ml azul de bromofenol, 0.15 M Tris HCl ajustado a pH 6.8). Por otro lado, se tomaron 40 μ l del sobrenadante que posee las proteínas de la fracción soluble y se le añadieron 10 μ l de tampón de carga Laemmli 5X.

6. Análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas por *Western Blot*

6.1. Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), empleando el sistema *MiniProtean 3* (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:bisacrilamida 30:0.8 al 3%, 125 mM Tris-HCl pH 6.8 y SDS 0.1%) y una zona inferior de separación (acrilamida:bisacrilamida 30:0.8 al 8%, 375 mM Tris-HCl pH 8.8 y SDS 0.1%). El tampón de resolución empleado fue SDS-PAGE 1X compuesto por 0.19 M glicina y 0.1% SDS (pH ajustado a 8.3 con Tris).

La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a una diferencia de potencial de 80 V mientras que la segunda parte (resolución) se realizó bajo una diferencia de potencial de 120 V.

6.2. Transferencia a membrana (*Western Blot*)

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Millipore*). Para la transferencia, se utilizó el set *Mini-Trans Blot* (BioRad) y el tampón de transferencia TOWBIN (0.19 M glicina, 0.01% SDS y 20% metanol, ajustando el pH a 8.3 con Tris). La transferencia se realizó bajo una diferencia de potencial constante de 100 V durante 1,5 horas a una temperatura de 4 °C.

6.3. Tinción de membrana

Esta tinción se realizó una vez terminada la transferencia proteica a la membrana, con el objeto de comprobar la eficiencia de dicha transferencia y como control interno de carga. En este trabajo se emplearon indistintamente dos tipos de soluciones colorante: *Direct Blue* o tinción Ponceau,.

Tinción *Direct Blue* (Aldrich Chemistry)

En algunos casos, la disolución colorante empleada fue *Direct Blue* (Aldrich Chemistry). Se sumergieron las membranas en la solución colorante (0,008% [w/v] DB71) durante 2 minutos en agitación .

A continuación, se eliminó el exceso de colorante por medio de la Solución de Lavado de *Direct Blue* (40% de etanol absoluto y 10% de ácido acético glacial). Tras capturar la imagen de la membrana teñida, se eliminó el colorante con la Solución de Decolorante de *Direct Blue* (50% de etanol absoluto, bicarbonato sódico (NaHCO₃) 1 M).

Tinción Ponceau S (Sigma)

En otros casos se sumergieron las membranas en la solución colorante Ponceau (0,1% Ponceau S (Sigma), 1% ácido acético) durante 2 minutos en agitación. A continuación se retiró el exceso de colorante lavando con agua destilada.

6.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana

Para la detección de las proteínas a analizar, en primer lugar, se bloquearon los sitios de unión no específicos de la membrana sumergiéndola en la Solución de Bloqueo (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 2% de leche desnatada) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente, se retiró dicha solución y se añadió la Solución de Bloqueo con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés en la dilución adecuada (Tabla 3.2). La membrana con la solución con anticuerpo primario, se dejó incubando a 4°C en agitación durante aproximadamente 16 horas.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl y 20 mM Tris-HCl pH 7.6). Una vez eliminado de la membrana el exceso de anticuerpo primario, se añadió la solución de bloqueo con el anticuerpo secundario específico en la dilución adecuada (Tabla 3.2) y se dejó incubando durante un tiempo mínimo de 1 hora, en agitación. Finalizada la incubación, se realizaron 3 nuevos lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

Anticuerpo Primario	Dilución	Proveedor	Anticuerpo Secundario	Dilución	Proveedor
α -GFP	1:1000	Roche	α -HRP-mouse	1:10000	Amersham
α -Pma 1	1:20000	homemade (Serrano lab)	α -HRP-rabbit	1:5000	Amersham

Tabla 3.2. Anticuerpos empleados en este trabajo. En la tabla se describen los anticuerpos que se han utilizado durante la realización del presente trabajo, detallando la dilución en la que se ha utilizado cada uno de ellos.

La detección se realizó utilizando el sistema de quimioluminiscencia *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal de quimioluminiscencia se detectó usando películas de rayos X (*Biomax Light-1, Kodak*).

6.5. Stripping para nueva inmunodetección sobre membrana

Ante la necesidad de hibridar una membrana con más de un anticuerpo, dichas membranas (conservada as $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) se sumergieron en el tampón de *Stripping* con un contenido de 100 mM de 2-mercaptoetanol, 2% de SDS y 62.5 mM de Tris ajustado a pH 6.7 con Tris, a 50°C , durante 30 minutos, en agitación ocasional. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS 1X-Tween 20 a temperatura ambiente. Finalmente, y previamente a la adición del nuevo anticuerpo primario, se bloqueó la membrana durante 30 minutos con 10 ml de TBS 1X-Tween 20 con un contenido del 2% de leche desnatada

7. Estudio de localización celular de proteínas por microscopía confocal

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron sobre células vivas crecidas hasta fase exponencial empleando un microscopio confocal invertido *Leica TCS SL* con un objetivo 40X /1.25 de apertura numérica y objetivo de inmersión. Se excitó con luz de longitud de onda de 488 nm y se detectó la luz de fluorescencia emitida en un rango de longitud de onda entre 500 y 530 nm, tal y como se ha descrito en otros trabajos (Yenush *et al.*, 2005)

8. Otras medidas fisiológicas

8.1 Medida del consumo de glucosa.

Las cepas indicadas se crecieron en YPD a pH 4.5 hasta fase logarítmica. Posteriormente se recogieron estas células y se diluyeron en medio fresco a una densidad óptica (OD_{660}) de 0,2. A continuación se recogieron muestras por centrifugación en los tiempos indicados (ver fig 4.1). Se determinó el número de células así como la concentración de glucosa del medio empleando protocolos estándar que emplean un conjunto de reacciones acopladas de glucosa oxidasa (Roche) y peroxidasa (Roche), con la sal de diamonio de 2,2-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico, Merck), como cromóforo, a 420nm. Los datos obtenidos se representaron como concentración de glucosa ($\mu\text{M}/\text{células}/\text{ml}$). Las barras de error representan las desviaciones estándar de cada medida por triplicado (ver fig. 4.1). Se observaron resultados idénticos en dos experimentos independientes.

8.2 Medida de la producción de etanol.

Las cepas indicadas se crecieron en YPD a pH 4.5 hasta fase logarítmica (7×10^6 células / ml). A continuación se recogieron 1.5 ml de cultivo por centrifugación, en los tiempos indicados. Se estimó posteriormente la concentración de etanol presente en cada muestra por medio de procedimientos estándar de cuantificación de la producción de NADH durante la conversión de etanol a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa (Sigma) a 340 nm. Las barras de error representan las desviaciones estándar de cada medida por triplicado (ver fig. 4.2).

9. Tratamientos celulares

9.1 Ayuno de KCl y Metionina y tratamiento de Metionina

En el ensayo de ayuno de KCl, las cepas indicadas se crecieron en SD suplementado con KCl 0.1M hasta fase logarítmica. A continuación se lavaron dos veces con agua estéril, y se cultivaron en un medio privado de KCl, durante 2h (Figura 4.4). En el caso del ayuno de metionina, en primer lugar las células fueron crecidas en un medio SCD suplementado con KCl 0.1M. Una vez en fase exponencial, se lavaron dos veces con agua estéril, y se crecieron en medio SD, y paralelamente en medio SD con KCl 0.1M (Figura 4.6). En el caso de tratamiento con Metionina (figura 4.6 y 4.11) las células fueron crecidas en medio SCD hasta fase exponencial, posteriormente fueron lavadas dos veces con agua estéril e incubadas durante 4h en medio mínimo SD; transcurrido dicho tiempo, se hizo un tratamiento de metionina, cuya concentración final es 20 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 minutos. En todos los casos, los medios de crecimiento para cada una de las cepas indicadas fueron suplementados con los aminoácidos correspondientes, y fueron recogidos 10 ml de muestras a una OD_{660} de 0.5, para análisis Western.

Resultados

RESULTADOS

1. Rastreo dirigido a identificar las dianas de Hal4 y Hal5

Perez-Valle. J y colaboradores, del 2007, observaron que las cepas mutantes que carecen de los genes codificantes de las quinasas *HAL4* y *HAL5*, presentan una reducción en la estabilidad de la membrana plasmática en una serie de transportadores. Entre ellos se incluye el transportador de potasio de alta afinidad, Trk1 (Perez-Valle *et al.*, 2007).

Con el objetivo de proseguir en la identificación del mecanismos de acción de estas quinasas, previo a este trabajo, se realizó un rastreo genético de las dianas de estas quinasas basado en el supuesto de que ante la carencia de un sustrato clave de estas quinasas, la sobreexpresión de estos genes de halotolerancia, no conferiría tolerancia al catión tóxico cloruro de litio. Puesto que no parece probable que las quinasas Hal4 y Hal5 directamente fosforilen múltiples transportadores, se probaron genes implicados en el transporte de vesículas, reciclaje y degradación. También se incluyeron genes cuyos productos se ha descrito que interaccionan con Hal4 o Hal5.

En todos los cepas probadas (32 mutantes diferentes), salvo en el mutante *trk1*, donde si se observa una pérdida de la tolerancia al catión tóxico LiCl al sobreexpresar tanto *HAL4* o *HAL5*, los resultados fueron negativos (Perez-Valle *et al.*, 2010).

2. Análisis transcriptómico del mutante *hal4hal5*.

Debido a la falta de información generada por los abordajes anteriores, y con el objetivo de identificar los genes cuya expresión está afectada por la disrupción de los genes *HAL4* y *HAL5* se planteó realizar un análisis transcripcional del mutante *hal4 hal5*.

Para la caracterización del mutante *hal4 hal5* en base a su transcriptoma, se compararon los perfiles de transcripción de la cepa silvestre y de la cepa mutante *hal4 hal5* en dos fondos genéticos: W303 y BY4741, por medio de microarrays de DNA. Estos experimentos fueron realizados por el grupo como paso previo al comienzo del presente trabajo y se presentan aquí ya que representan la base del proyecto realizado.

Las comparaciones de los niveles de expresión génica se llevaron a cabo cultivando las células en un medio YPD ligeramente acidificado (la disminución del pH a 4.5 se obtuvo mediante la adición de ácido succínico, ver Materiales y Métodos). En estas condiciones, las diferencias en los defectos de crecimiento entre ambas cepas son mayores a las que se observan al crecer las células en medio YPD sin acidificar.

Se realizaron dos experimentos independientes, uno para cada uno de los dos fondos genéticos.

En el fondo genético W303 se han seleccionado 709 genes de los cuales 457 presentaban niveles de expresión más altos en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre, y 252 genes presentaban menores niveles de expresión en la cepa *hal4 hal5* que en la cepa silvestre. En el fondo genético BY4741 el grupo de genes expresados diferencialmente fue menor: 260. En este caso se seleccionaron 194 genes con mayores niveles de expresión en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre y 66 genes presentaron un nivel de expresión más bajo en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre.

A pesar de la diferencia entre el número de genes expresados diferencialmente en el mutante *hal4 hal5* que es considerablemente mayor en el fondo genético W303, la coincidencia entre genes

inducidos y reprimidos en ambos fondos genéticos es muy alta. Aproximadamente un 70% (139 de 194) de los genes que están inducidos en el mutante *hal4 hal5* en el fondo genético BY4741 también han sido seleccionados como inducidos en este mutante en el fondo genético W303. Lo mismo sucede con los genes que aparecen como reprimidos, donde cerca del 60% (40 de 66) de dichos genes en el mutante *hal4 hal5* aparecen como reprimidos tanto en el fondo genético BY4741, como en el fondo genético W303.

Se utilizó la herramienta de análisis *GO Term Finder* (The Gene Ontology Consortium, 2008) de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/GO/goTermFinder>) para encontrar categorías funcionales que se encuentren sobre-representadas en la lista de genes, tanto inducidos como reprimidos (Tabla 4.1).

Gene category	Functional categories for the indicated strain (growth medium)		
	W303-1A (YPD pH 4.5)	BY4741 (YPD pH 4.5)	W303-1A (YPD pH 6.0)
Induced genes	Energy metabolism <i>ATP biosynthesis</i> <i>Aerobic respiration</i> <i>Electron transport</i>	Energy metabolism <i>ATP biosynthesis</i> <i>Aerobic respiration</i> <i>Electron transport</i>	Energy metabolism <i>ATP biosynthesis</i> <i>Aerobic respiration</i> <i>Electron transport</i>
	Sulfate assimilation <i>Methionine biosynthesis</i>	Sulfate assimilation <i>Methionine biosynthesis</i>	Sulfate assimilation <i>Methionine biosynthesis</i>
	Carbohydrate metabolism <i>Trehalose biosynthesis</i> <i>Glycogen biosynthesis</i> <i>Alcohol catabolism</i> <i>Monosaccharide catabolism</i>		
	Stress response		
Repressed genes	Nucleotide metabolism <i>Adenine biosynthesis</i>	Nucleotide metabolism <i>Adenine biosynthesis</i>	Nucleotide metabolism <i>Adenine biosynthesis</i>
	Amino acid metabolism	Amino acid metabolism	Amino acid metabolism
	Ribosome biogenesis	Iron assimilation	
	Ergosterol biosynthesis		

^a Functional categories were identified using the Gene Ontology Term Finder available through the *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>). Categories with a *P* value of <0.01 were considered significant. Relevant subcategories are shown in italics.

Tabla 4.1. Resumen de las categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en el mutante *hal4 hal5*, adaptada de Perez-Valle et al 2010.

Tanto en el fondo genético BY4741 como en el W303, aparecen sobre-representadas de forma significativa en la lista de genes inducidos del mutante *hal4 hal5* varias categorías funcionales relacionadas con el metabolismo energético y con la asimilación de sulfato. Además en el fondo genético W303, donde la lista de genes inducidos era mayor, han aparecido otras nuevas, que se relacionan con el metabolismo de carbohidratos y la respuesta a estrés.

Entre los genes que aparecen reprimidos en el mutante *hal4 hal5*, en el fondo BY4741 aparecen sobre-representadas de forma significativa categorías funcionales relacionadas con el metabolismo de nucleótidos, más concretamente con la biosíntesis de adenina, y categorías relacionadas con el metabolismo de aminoácidos. También ha aparecido sobre-representada de forma significativa en menor medida la categoría funcional de asimilación de hierro. En el fondo genético W303, entre los genes reprimidos en el mutante *hal4 hal5* también se observa una sobre-representación de estas categorías funcionales con la excepción, de la categoría de asimilación de hierro, que no aparece representada. Por otra parte, en este fondo genético, entre los genes reprimidos en el mutante *hal4*

hal5 también se encuentran sobre-representados algunos genes relacionados con las categorías funcionales de biogénesis de ribosomas y biosíntesis de ergosterol.

Cabe destacar, que la realización de los experimentos en estos dos fondos genéticos que poseen distintos genotipos en cuanto a la dependencia de adenina y metionina tuvo como objetivo descartar que los efectos observados fueran debidos a las auxotrofas propias de la cepa mutante. El fondo genético W303 es *ade2 MET15* y el fondo genético BY4741 es *ADE2 met15*. Se puede observar que la identificación de los genes diferencialmente expresados relacionados con la biosíntesis de metionina y adenina no es debida al fondo genético puesto que los resultados son prácticamente idénticos y por tanto independientes de estos.

Además, se llevaron a cabo estos mismos experimentos en medio YPD sin acidificar. En estas condiciones los resultados fueron idénticos a los experimentos en YPD pH 4.5. Se encontró una inducción de genes relacionados con el metabolismo energético y la asimilación de sulfatos, y una represión de genes relacionados con la biosíntesis de adenina y el metabolismo de aminoácidos.

Se pudo concluir a partir de estos resultados que en la cepa carente de los genes *HAL4* y *HAL5*, existe una alteración en el control del metabolismo del nitrógeno y el carbono

3. Metabolismo respiratorio en el mutante *hal4 hal5*

En el análisis transcriptómico se observó una inducción de genes relacionados con el metabolismo energético. Por ejemplo, genes relacionados con la cadena respiratoria se acumulan en mayores niveles en el mutante *hal4 hal5*.

Por otro lado, como se ha mencionado en la introducción, en la cepa mutante *hal4 hal5*, el transportador de glucosa de baja afinidad Hxt1 presenta un defecto en su localización, ya que en ausencia de potasio, se puede observar una marcada acumulación vacuolar de esta permeasa. Además, también se ha visto que el transportador de alta afinidad Hxt4 y los genes que codifican para las hexoquinasa *HXK1*, *HXK2* y *GLK1* están inducidos en esta cepa (Perez-Valle *et al.*, 2010)

Todas estas evidencias podrían ser consistentes con una relativa reducción en la toma de glucosa, lo que conduce a pensar que la ausencia de los genes *HAL4* y *HAL5* origine problemas de obtención de energía aprovechable por la célula y por ello la inducción de este metabolismo.

Para apoyar esta hipótesis se procedió a medir el consumo de glucosa en el WT y en el mutante *hal4 hal5*, a través de protocolos estándar que emplean un conjunto de reacciones acopladas de glucosa oxidasa (Roche) y peroxidasa (Roche), tal y como viene indicado en materiales y métodos. Como puede observarse en la figura 4.1, el doble mutante *hal4 hal5* consume glucosa en menor proporción y a una tasa menor que el WT.

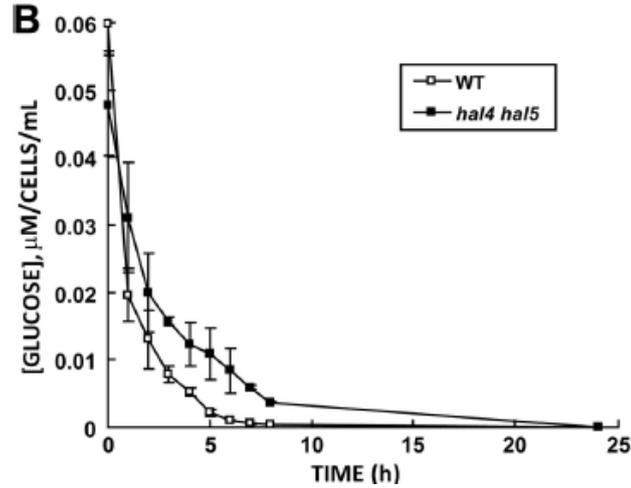


Figura. 4.1 Cambios en el metabolismo respiratorio en el mutante *hal4 hal5*. Las cepas indicadas fueron cultivadas hasta fase exponencial en medio YPD pH 4.5. Posteriormente fueron medidas a OD₆₆₀ y ajustadas a 0.2 en medio fresco. Se tomaron muestras en los tiempos indicados en la figura y se determinó la cantidad de glucosa del medio. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras de error representan las desviaciones estándar de cada medida por triplicado.

Además, se conoce que durante la fase logarítmica, las células de levadura alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo, en el que a partir de una serie de reacciones bioquímicas la glucosa se degrada a etanol, en el proceso de la glicólisis que rinde energía aprovechable por la célula.

Es por ello que se midió también la producción de etanol en el doble mutante *hal4 hal5* y en el WT. Si las células *hal4 hal5* consumen menos glucosas debido a un defecto en el metabolismo respiratorio, se espera que la producción de etanol también sea menor, en comparación con las células WT. La figura 4.2 confirma esta hipótesis.

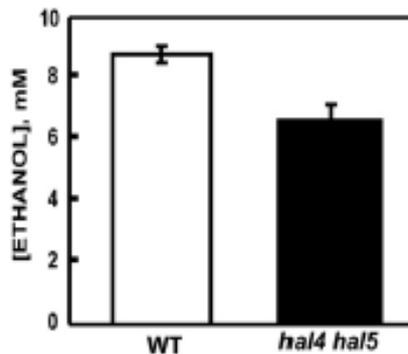


Figura 4.2 Cambios en el metabolismo respiratorio: producción de etanol. Las cepas indicadas (WT, W303-1A) fueron cultivadas hasta fase exponencial en medio YPD pH 4.5. Posteriormente se tomaron muestras para determinar la producción de etanol como viene descrito en el apartado Materiales y Métodos. Los gráficos muestran los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Podemos decir que esta reducción en el flujo glicolítico podría explicar la inducción del metabolismo respiratorio en el mutante con el objetivo de optimizar la producción de energía por las células.

Otra prueba más de ello es la mayor actividad succinato dehidrogenasa (SDH) observada en el mutante *hal4 hal5* (Perez-Valle *et al.*, 2010), un indicador de la funcionalidad de las mitocondrias y

por consiguiente de esta mayor inducción de genes relacionados con el metabolismo energético que se ha observado en el análisis transcriptómico del mutante *hal4 hal5*.

4. Toma de metionina en el mutante *hal4 hal5*

Otra de las categorías funcionales que ha aparecido sobre-representada entre los genes inducidos en el mutante *hal4 hal5* ha sido la de asimilación de sulfatos, y más concretamente la de biosíntesis de metionina.

Prácticamente, todos los genes implicados en la biosíntesis de metionina aparecen inducidos en el mutante *hal4 hal5*, en al menos uno de los experimentos descritos (Perez-Valle *et al.*, 2010). Por ello, se planteó la hipótesis de que dicha inducción de los genes de biosíntesis de metionina en el mutante pueda ser consecuencia de un defecto en la toma de dicho aminoácido.

Para comprobar esta hipótesis se han realizado ensayos de toma de metionina en el mutante *hal4 hal5* y en la cepa silvestre. Se cultivaron las células hasta fase exponencial en idénticas condiciones a las del análisis transcriptómico, es decir, en YPD acidificado a pH 4.5. A continuación se recogieron las células por centrifugación, se lavaron y se realizaron los ensayos de toma de metionina marcada radioactivamente. Como se puede ver en la figura 4.3, parece que el mutante *hal4 hal5* presenta menores niveles de toma máxima de metionina que la cepa silvestre después de 10 minutos de ensayo (en torno a un 50% menor), así como una menor velocidad inicial de toma.

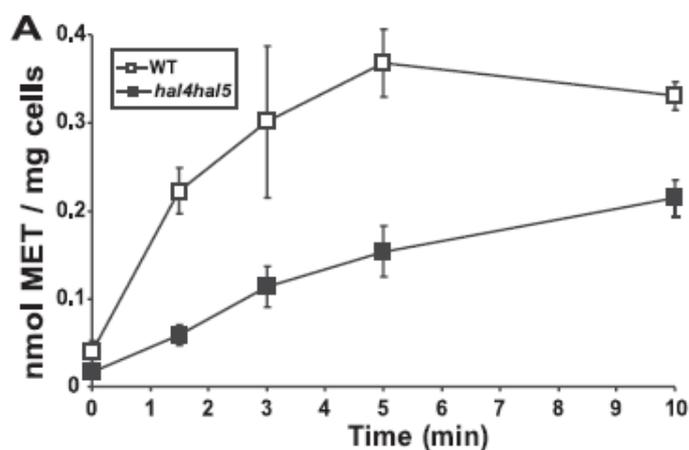


Figura. 4.3. Toma de metionina en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre. Adaptada de Perez-Valle *et al* 2010

Las cepas indicadas (fondo genético W303) se crecieron hasta fase logarítmica, se recogieron las células y se utilizaron en ensayos de toma de metionina como se describe en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron en medio YPD pH 4.5 (WT: □; *hal4hal5*: ■). Los datos se muestran en pmoles de metionina por mg de células, y son la media de tres experimentos independientes.

Este defecto en la toma de metionina que se observa en el mutante podría estar provocando un ayuno de este aminoácido, y ser también la causa de los mayores niveles de expresión para los genes de biosíntesis de metionina que se observan en el mutante *hal4 hal5*.

4.1 Estabilidad del transportador de la membrana Mup1 en el mutante *hal4 hal5* ante ayuno de K⁺

Una vez confirmado el defecto en la toma de metionina del doble mutante *hal4 hal5*, la siguiente pregunta que se planteó fue si esta podía ser debida a una deslocalización en la membrana plasmática de algún transportador. Los principales candidatos de este defecto fueron las permeasas Gap1 y Mup1.

Como se ha comentado en la introducción, el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática en *S. cerevisiae* es un proceso activo mediado por proteínas de membrana conocidas como permeasas (para la definición de permeasas consulte (Andre, 1995)). Además, en levadura, se conoce que cada aminoácido se transporta por dos clases de permeasas: específicas o no específicas. La permeasa que es capaz de transportar todos los L-aminoácidos de las proteínas así como de compuestos relacionados, algunos D-aminoácidos y análogos tóxicos de forma general, es Gap1 (Wiame *et al.*, 1985). Sin embargo, esta permeasa sólo funciona bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, en presencia de una fuente de nitrógeno eficiente como el amonio, la permeasa Gap1 permanece inactiva. Esta regulación específica de la actividad de Gap1 implica múltiples eventos transcripcionales y post-transcripcionales (Jauniaux and Grenson, 1990), sin embargo, por el tipo de regulación de esta permeasa, el defecto de metionina observado en el doble mutante parece ser debido a permeasas que transportan aminoácidos de forma específica, ya que en las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento (medio rico YPD) Gap1 debe estar inactiva.

En presencia de amonio como fuente de nitrógeno, se conoce que los aminoácidos se transportan a través de la membrana plasmática por permeasas específicas, y se ha documentado en la literatura la existencia de permeasas de alta y baja afinidad para L-triptófano (Schmidt *et al.*, 1994), leucina-L (Kotliar *et al.*, 1994), L-ácido glutámico (Darte and Grenson, 1975), L-histidina (Crabeel and Grenson, 1970), L-metionina (Gits and Grenson, 1967) y L-arginina (Grenson *et al.*, 1966)

Respecto al transporte de metionina en levadura, que es el transporte objeto de estudio, es llevado a cabo por al menos siete permeasas diferentes. Estas permeasas se diferencian por su afinidad, su capacidad de transporte y especificidad, y es esta redundancia la que permite a las células captar metionina de un amplio rango de ambientes distintos. De estas siete proteínas de membrana, Mup1, Mup3, Agp1, Agp3, Bap2, Bap3 y Gnp1, solo Mup1 y Mup3, son permeasas de alta especificidad, mientras que las otras cinco, son transportadores con amplia especificidad de sustrato (Menant *et al.*, 2006)

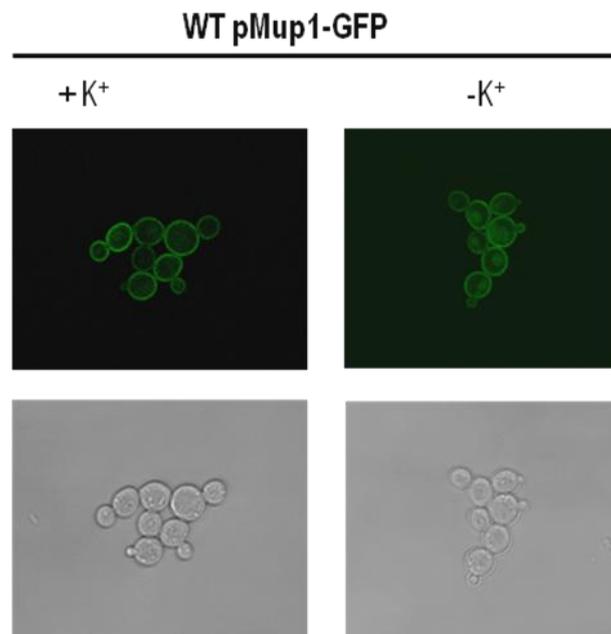
Cabe destacar además, que la familia Mup, es una familia de transportadores específicos diferente a la de las permeasas específicas codificadas por los genes *CAN1* (arginina), *LYP1* (leucina), *HIP1* (histidina), *PUT4* (prolina), *YCC5* (glutamina), *TAT1* (triptófano), y *TAT2* (triptófano). La principal diferencia entre ambas familias reside en que la primera familia posee 13 dominios transmembrana mientras que las otras permeasas sólo contienen 12 dominios transmembrana (Schuler *et al.*, 1991) En esta familia Mup de transportadores de metionina hay dos miembros principales. Por un lado encontramos Mup1, la permeasa de alta afinidad de metionina, que es muy específica para metionina; sólo algunos análogos estructurales muy próximos como metSO, selenometionina, etionina y ethSO, inhiben el transporte de metionina por Mup1 (Gits and Grenson, 1967a). Por otro lado, el gen *MUP3* codifica para la permeasa de metionina de muy baja afinidad.

Por todos estos datos, nosotros consideramos que la deslocalización de la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1 podría ser la responsable del defecto en la toma de metionina observada en el doble mutante *hal4 hal5*.

Para abordar esta hipótesis se cultivaron células WT y células del doble mutante *hal4 hal5* que habían sido transformadas previamente con el plásmido multicopia pRS416-P_{MUP1}-MUP1-GFP, donde Mup1 está bajo el control de su propio promotor y fusionado a la proteína GFP, hasta fase exponencial y para su visualización por microscopía confocal.

La localización de la proteína de fusión Mup1-GFP en ambas cepas se estudió en dos condiciones distintas: en primer lugar cultivando las células en un medio mínimo suplementado con KCl 0.1M y en segundo lugar en células creciendo en medio no suplementado con KCl durante un tiempo mínimo de 2 horas.

Como se observa en la figura 4.4, tanto en presencia del suplemento de potasio como en su ausencia, la permeasa Mup1 en el WT posee una correcta localización en la membrana plasmática. Sin embargo en el caso del doble mutante *hal4 hal5*, en un medio suplementado con potasio, la cantidad de Mup1-GFP observado en la membrana plasmática es mucho menor a la observada en el WT, y tanto la presencia como la ausencia de potasio en el medio da lugar a una gran acumulación de GFP vacuolar. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Perez-Valle y colaboradores donde se obtuvieron evidencias de que las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 están involucradas en la modulación del tráfico de un conjunto de proteínas de la membrana plasmática como el transportador de potasio Trk1, y otras proteínas de la membrana plasmática como la permeasa de uracilo Fur4 y la permeasa de arginina Can1, bajo condiciones estándar de crecimiento (Perez-Valle *et al.*, 2007)



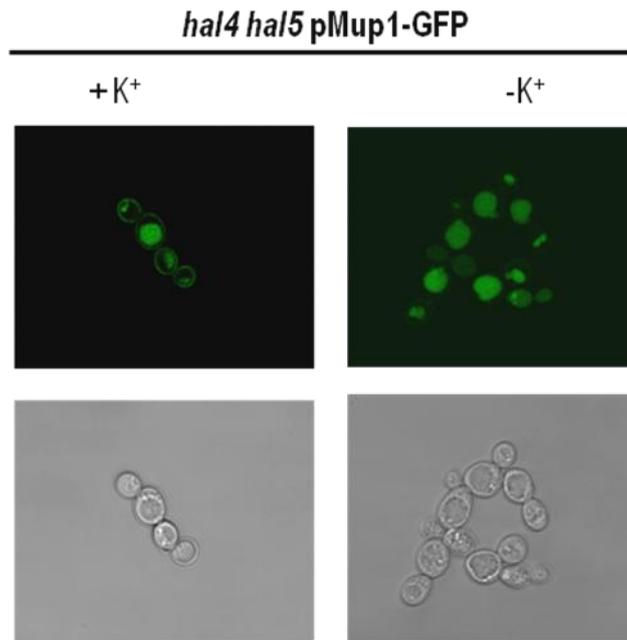


Figura 4.4. Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5*. Las cepas indicadas fueron transformadas con un plásmido que expresa la fusión GFP con la proteína Mup1, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio y en medio mínimo sin suplemento de potasio durante 2 horas y analizadas por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación.

Estos resultados han sido confirmados por análisis Western, empleando un anticuerpo Anti-GFP, para el análisis de los extractos proteicos fraccionados. Como se observa en la figura 4.5, en ausencia de los genes *HAL4* y *HAL5* hay una reducción de la señal de Mup1-GFP en la membrana plasmática correspondiente a la fracción insoluble y que se asocia a una mayor acumulación de GFP en la fracción soluble, la cual contiene el lumen vacuolar.

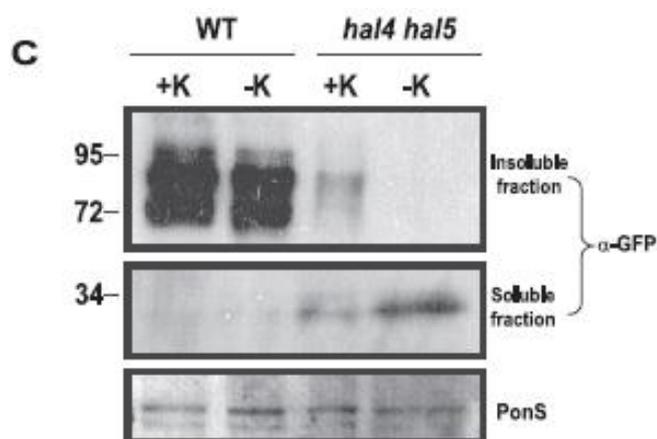


Figura 4.5. Análisis Western de la proteína Mup1. Las proteínas de la fracción soluble e insoluble se aislaron de las cepas indicadas expresando un plásmido con la fusión Mup1-GFP, tratadas como se ha descrito en la figura anterior. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Mup1-GFP, y se ha mostrado la tinción de la membrana con Ponceau S (PonS) como control de carga de la proteína. Los marcadores moleculares de peso se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Todos estos datos apoyan nuestra hipótesis de que la inducción de los genes de biosíntesis de metionina es debida a una reducción en la toma de metionina y más específicamente a un defecto en la localización de la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1.

Además se quiso comprobar si este defecto observado en la toma de aminoácidos es específico de metionina o es en realidad debido a un efecto más general, y ocurre con otros aminoácidos. Para ello se realizaron ensayos de toma de leucina. Los resultados fueron consistentes con la hipótesis de que el doble mutante presenta un defecto en la toma de aminoácidos en general, ya que se pudo observar que la toma máxima de leucina a los 10 minutos es alrededor de un 50 % menor en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre (Perez-Valle *et al.*, 2010).

El descenso en los niveles de toma de algunos aminoácidos que se ha descrito anteriormente para la cepa mutante *hal4 hal5* podría producir en estas células un ayuno de aminoácidos. Ello daría lugar a un cambio en los niveles de actividad de la ruta de respuesta al ayuno de aminoácidos GCN.

El activador Gcn4 está regulado por un complejo mecanismo de control traduccional que hace que en células que están sufriendo un ayuno de aminoácidos aumenten los niveles de Gcn4, lo que a su vez produce un aumento en la transcripción de los genes de biosíntesis de aminoácidos que se encuentran bajo su control. Este fenómeno es esencial para mantener el crecimiento celular en condiciones de ayuno de aminoácidos (Hinnebusch, 2005) .

Es por ello que se midieron los niveles de actividad de esta ruta GCN mediante un análisis de la actividad β -galactosidasa en cepas WT y *hal4 hal5* transformadas con un plásmido que contiene una fusión del promotor del gen *GCN4* y el gen *lacZ*, comprobándose que la cepa mutante *hal4 hal5* presenta de forma constitutiva una mayor actividad de la ruta GCN que la cepa silvestre, lo que refuerza la hipótesis del ayuno de aminoácidos que está sufriendo esta cepa.

4.2 Acumulación de Mup1 a la membrana plasmática

Algunos autores han descrito que la degradación vacuolar de la permeasa de alta afinidad Mup1 se produce ante la presencia de un exceso de metionina en el medio de crecimiento (Menant *et al.*, 2006; Teis *et al.*, 2008)

Por otro lado, hemos observado previamente (figura 4.4), que la estabilidad del transportador de metionina de la membrana plasmática Mup1 se ve afectada en el doble mutante *hal4 hal5*. En una situación de privación del potasio del medio, esta permeasa se degrada en la vacuola, se cree que, por la vía de endocitosis.

El objetivo siguiente es estudiar si la síntesis y llegada de Mup1 a la membrana plasmática se encuentran también alteradas en el doble mutante *hal4 hal5*.

En primer lugar se volvió a estudiar la localización de la proteína de fusión Mup1-GFP en la cepa WT y en el doble mutante *hal4 hal5*. Se cultivaron las células en un medio mínimo suplementado con una concentración de metionina 20 μ g/ml y 0.1M de KCl hasta fase exponencial. Esta concentración de metionina extracelular se conoce que es capaz de desencadenar la represión del gen *MUP1*. Posteriormente tras ser eliminada la metionina del medio, se cultivaron paralelamente en presencia de KCl 0.1M, y en ausencia de KCl.

Como había sido previsto por descripciones en la literatura (Menant *et al.*, 2006; Teis *et al.*, 2008) en ambas cepas, ante la presencia de altas concentraciones de metionina en el medio, se observa como las células de levadura remodelan su capacidad de transporte de metionina, de forma que el transportador de metionina Mup1 es degradado en la vacuola (figura 4.6).

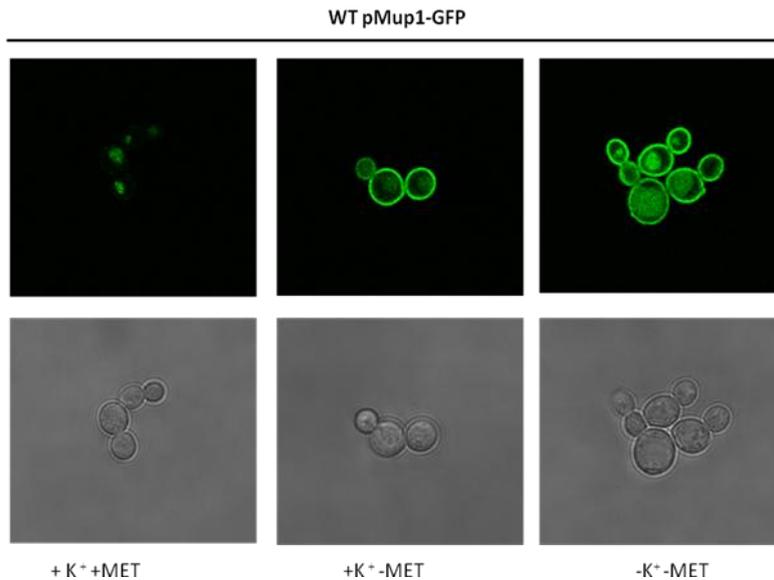


Figura 4.6. Localización subcelular de la permeasa Mup1 en la cepa silvestre. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización de la fusión Mup1-GFP en la cepa silvestre. La cepa transformada fue cultivada en un medio mínimo suplementado con una concentración de metionina 20µg/ml y 0.1M de KCl hasta fase logarítmica, y posteriormente tras ser eliminada la metionina del medio, se cultivaron paralelamente en presencia de KCl 0,1M, y en ausencia de KCl.

Sin embargo, ante un ayuno de metionina, mientras que el WT no muestra ningún defecto en la llegada de Mup1 a la membrana plasmática, el doble mutante *hal4 hal5* sí parece presentar un defecto en este proceso. Como se observa en la figura 4.7 la cepa *hal4 hal5* presenta un menor contenido de Mup1 en la membrana plasmática, y un alto contenido vacuolar, sugiriendo la dificultad del doble mutante de acumular Mup1 en la membrana plasmática. Además, cuando se elimina del medio el potasio, como ya habíamos observado previamente (figura 4.7) se incrementa la fluorescencia en la vacuola, indicando que el defecto podría ser mayor en estas condiciones.

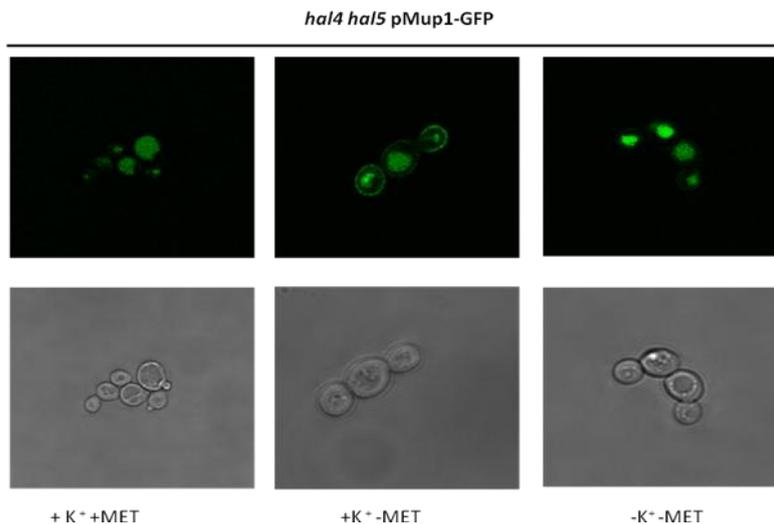


Figura 4.7. Localización subcelular de la permeasa Mup1 en la cepa *hal4 hal5*. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización de la fusión Mup1-GFP en la cepa silvestre. La cepa transformada fue cultivada en un medio mínimo suplementado con una concentración de metionina 20µg/ml y 0.1M de KCl hasta fase logarítmica, y posteriormente tras ser eliminada la metionina del medio, se cultivaron paralelamente en presencia de KCl 0,1M, y en ausencia de KCl.

Estos resultados se confirmaron por análisis Western empleando un anticuerpo Anti-GFP, como se puede observar a continuación (figura 4.8). Se analizó el extracto proteico correspondiente a la

fracción insoluble, donde pudimos comprobar como el contenido de Mup1 ante un ayuno de metionina, es mucho menor en el mutante *hal4 hal5*, en comparación con el WT.

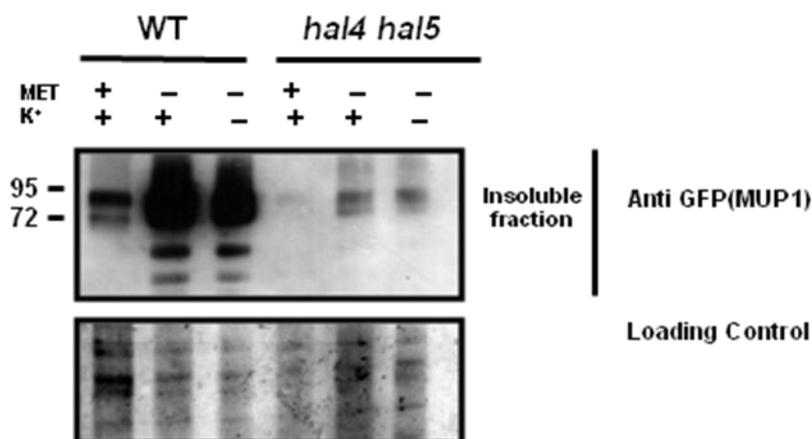


Figura 4.8. Análisis Western de la proteína Mup1. Las proteínas de la fracción soluble e insoluble se aislaron de las cepas indicadas expresando un plásmido con la fusión Mup1-GFP, tratadas como se ha descrito en la figura anterior. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Mup1-GFP, y se ha mostrado la tinción de la membrana con *Direct Blue* como control de carga de la proteína. Los marcadores moleculares de peso se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos hasta el momento sobre la dificultad de esta cepa carente de los genes *HAL4* y *HAL5* en la toma de metionina, sugiriendo un aspecto adicional.

4.3 Regulación de Mup1

La familia de los ARTs “Arrestin-related trafficking adaptors” son una familia proteica cuya función es la captura de proteínas específicas de la membrana plasmática o *cargos* en el sistema endocítico celular. Dicha función se basa en la existencia de motivos PY en su secuencia, motivos necesarios para su reclutamiento por la ubiquitin ligasa Rsp5, que a través de sus dominios WW da lugar a la endocitosis del *cargo* correspondiente (Lin *et al.*, 2008) (Ver figura 1.7).

Existen evidencias genéticas y fisiológicas que apuntan hacia esta función de los ARTs como adaptadores de la ubiquitin ligasa dirigiendo la ubiquitinación mediada por Rsp5 y así regulando la endocitosis de proteínas transmembranas específicas de la membrana plasmática. Por ejemplo, algunos datos sugieren que tras ciertos estímulos, Art1 puede relocalizarse en la membrana plasmática, donde puede interactuar transitoriamente con *cargos* como Can1 (arginina), Mup1 (metionina) y Lyp1 (lisina), mediando su ubiquitinación por Rsp5.

Puesto que ya hay evidencias genética y moleculares de la interacción entre Mup1 y Art1 (Lin *et al.*, 2008; Nikko and Pelham, 2009), nuestro objetivo actual es estudiar la región de dicha interacción, y comprobar si dicha interacción es específica para Art1 o si se amplía a otros miembros de la familia, como Art2, Art3, y Art4.

Basándonos en la evidencia de que tras ciertos estreses, Art1 y Art2 parecen reconocer los elementos de la cola citosólica N-terminal de Can1 y Lyp1, respectivamente (Lin *et al.*, 2008), se apostó por que la región donde se produce la interacción entre el transportador Mup1 y Art1, se encuentra también en la cola citosólica del extremo N-terminal del transportador. Para estudiarlo se

clonaron las 180 pares de bases del extremo N-terminal de Mup1, con el fin de estudiar si este fragmento de la proteína es capaz de mediar la interacción que dará lugar a la internalización de dicha permeasa de la membrana plasmática por el adaptador Art1, y quizás por otros miembros de la familia Art.

Para detectar la existencia de interacciones entre proteínas se empleó la técnica denominada sistema de dos híbridos, sistema del Doble Híbrido o Y2H (Yeast two Hybrid). Esta técnica se basa en la existencia de factores de transcripción con dos dominios, ambos imprescindibles para que se produzca la expresión del gen que regulan; un dominio de unión al DNA y un dominio activador de la transcripción. Una proteína se fusiona a uno de los dominios del factor de transcripción y la otra al otro. Cuando las dos proteínas fusionadas a los dominios interaccionan, se reconstituye el factor de transcripción y se produce la transcripción de los genes reconocidos por el dominio de unión al DNA. En este caso, para la detección de la interacción entre Mup1 y algún miembro de los ARTs se utilizaron los “genes reporteros”, que regulan el factor de transcripción, *HIS3* y *ADE2* cuya expresión complementa las rutas biosintéticas de histidina y adenina, respectivamente. De este modo, cuando dos proteínas interaccionen, la cepa de levadura será capaz de crecer en un medio de cultivo sin estos compuestos esenciales para el crecimiento celular

Cabe destacar que existen algunas limitaciones graves en esta técnica como es el hecho de trabajar con proteínas transmembranales como es nuestro caso con la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1. En esta técnica, las proteínas que se quieren estudiar han de ir al núcleo para reconstituir el factor de transcripción en el promotor del gen reportero. Por tanto, para las proteínas que están excluidas del núcleo, como las proteínas transmembranales, no se puede aplicar esta técnica. Puesto que el ensayo utiliza el fragmento citosólico N-terminal de Mup1, dicha limitación parece quedar solventada.

El ensayo de doble híbrido se realizó mediante la transformación de la cepa THY.AP4 de levadura con el plásmidos, pBTM116 donde se clonó el extremo citosólico de Mup1, y con los plásmidos de sus posibles dianas Art1, Art2, Art3 y Art4 que fueron clonados en el vector pACTII; cada uno de estos vectores posee el dominio del factor de transcripción específico, como se describió en materiales y métodos. Además, para evitar el fenómeno de “transactivación” se utilizó como control negativo, células transformadas con pACTIIØ y el plásmido correspondiente a la región citosólica de Mup1. De esta forma pudimos descartar que el dominio de activación del vector pACTII es capaz por sí sólo de unirse al dominio de unión al DNA y de activar la transcripción del gen reportero, y por tanto, la generación de falsos positivos.

Los ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos) se realizaron en las siguientes condiciones: medio SCD: -TRP, -LEU, como control positivo, ya que TRP y LEU son los marcadores de selección de los plásmidos empleados en el ensayo doble híbrido. Como control negativo se utilizó el medio SCD. La cepa sin transformar es auxótrofa para uracilo, leucina, triptófano, histidina y adenina, por lo que sin suplementación de aminoácidos en el medio, no deberíamos observar crecimiento. Como medios para ver la interacción se utilizaron los medios SCD: - TRP, -LEU, -HIS y otro medio aún más restrictivo de SCD: - TRP, -LEU, -HIS, -ADE.

Como se observa en la Figura 4.9 sólo observamos crecimiento en el control positivo.

Las interpretaciones que se pueden dar a estos resultados son varias. Podría pensarse que no existe interacción física entre el extremo N-terminal de Mup1 y las proteínas Art1, Art2, Art3 y Art4, lo cual en el caso de Art1 algunos autores ya han demostrado dicha interacción (Lin *et al.*, 2008) por lo que esta conclusión se ceñiría al caso de las arrestinas Art2, Art3, y Art4. Otra explicación podría ser que los dominios de interacción entre los Arts y Mup1 no se encuentran en las 180pb del extremo N-terminal de este transportador de la membrana, lo cual explicaría la ausencia de interacción que hemos observado entre Mup1 y Art1. Una tercera posibilidad sería la existencia de un problema técnico que impide detectar interacciones positivas, o bien que dicho extremo N-terminal no es suficiente para dar lugar a una proteína funcional, es decir, es muy probable que al aislar el fragmento N-terminal del resto de la permeasa, se pierda su contexto molecular y con ello la capacidad de interactuar con otras proteínas. Para comprobar esta última hipótesis, se deberían utilizar otras técnicas que permitan analizar la interacción con la proteína entera y en su contexto fisiológico.

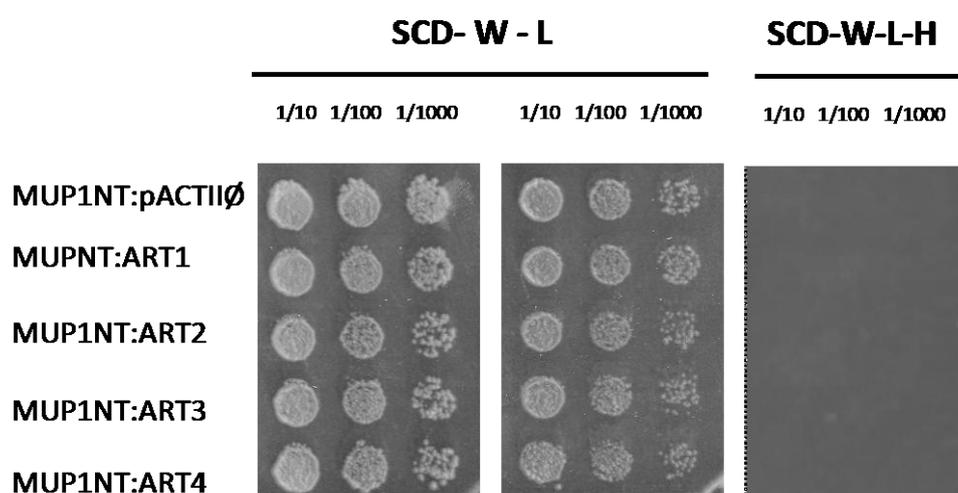


Figura 4.9. Ensayos de doble híbrido mediante la transformación de la cepa THY.AP4 con los plásmidos indicados. Las células se crecieron hasta saturación en medio mínimo suplementado con los aminoácidos indicados, se realizaron diluciones en serie y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se midió el crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28 °C.

4.4 Condiciones de visualización del transportador Mup1 en mutantes BY4741

En el trabajo publicado por Charles H. Lin y colaboradores (2008) se demuestra, por ensayos de inmunoprecipitación y de microscopía confocal, que Art1 y Mup1 interactúan cuando las células son expuestas a un exceso de metionina en el medio. En estos experimentos se observó que Art1, tras ser estimulada, se relocaliza en la membrana plasmática donde interactúa con su *cargo* Mup1, mediando su ubiquitinación por acción de Rsp5, como ya se había comentado previamente.

En el apartado anterior fuimos incapaces de demostrar esta interacción, por lo que se establecieron ensayos genéticos, en los que se pretendía reproducir las conclusiones de los experimentos realizados por Charles H. Lin y sus colaboradores, así como emplear estos ensayos para identificar otras proteínas implicadas en este proceso.

Como ya se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se han empleado dos fondos genéticos: W303 y BY4741, pero cabe destacar que en todos los experimentos anteriores donde se ha trabajado con la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1 se utilizó el fondo genético W303, ya

que su ruta de biosíntesis de metionina permanece intacta. Sin embargo, puesto que el fondo genético de la colección de mutantes que queremos emplear es el BY4741, auxótrofo para metionina, fue necesario fijar previamente las condiciones del experimento. Un exceso de metionina en el medio, que inevitablemente es necesario para el crecimiento de estas cepas, supone la endocitosis de Mup1, lo cual nos hace imprescindible estudiar la concentración de metionina que conduce a la degradación vacuolar de Mup1, así como los tiempos de lavado de la metionina del medio necesarios para la estabilización de Mup1 en la membrana, ya que si se desconocen, puede llevarnos a conclusiones erróneas. Con el fin de analizar este proceso se cultivaron células WT que expresan la proteína de fusión Mup1-GFP y se observaron por microscopía confocal. El medio de cultivo empleado fue SCD con un contenido en metionina de 10µg/ml. Se observó que dicha concentración es suficiente para originar la internalización en la vacuola de Mup1 (datos no mostrados), debido al exclusivo contenido de GFP vacuolar. Una vez las células se encontraban en fase logarítmica, se procedió a realizar un ayuno de metionina. Como se observa en la figura 4.10, un ayuno de metionina de tan solo 30 minutos es suficiente para que el transportador Mup1 se estabilice en la membrana. Sin embargo estudios posteriores establecieron que ayunos más largos optimizan las cantidades de Mup1 en la membrana plasmática.

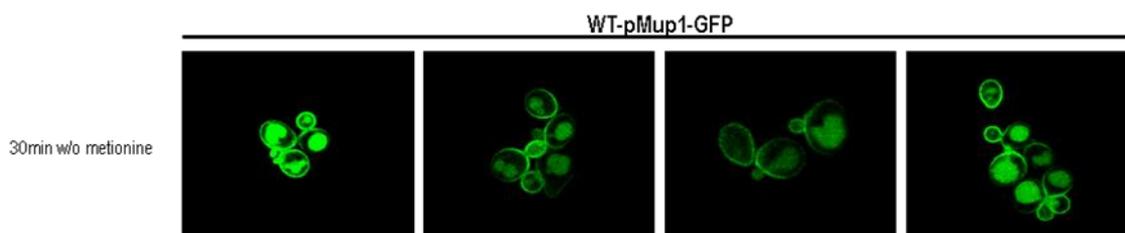


Figura 4.10. Condiciones de visualización del transportador Mup1 en el fondo genético BY4741 La cepa indicada fue crecida en un medio SCD suplementado con KCl 0.1M hasta fase logarítmica. Posteriormente estas células fueron lavadas con agua estéril y transferidas a un medio SD suplementado con KCl y sin metionina. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas tras 30 minutos del tratamiento de ayuno de metionina.

Una vez fijadas las condiciones, pudimos comenzar con los ensayos con los mutantes del fondo genético BY4741, cultivando las células WT, como control, así como las células mutantes *art1*, *art2*, expresando la proteína de fusión Mup1-GFP.

El objetivo de este experimento era confirmar la interacción observada por otros autores entre Mup1 y Art1, así como comprobar si dicha interacción era específica para el adaptador Art1, o si se ampliaba a algún otro miembro de la familia de los Arts. Para ello se estudió también la localización de Mup1 en un mutante *art2*. La hipótesis plantea que si existe interacción entre Mup1 y Art1, la adición de metionina a un medio con células del mutante *art1* transformadas con la proteína de fusión Mup1-GFP, no desencadenaría la internalización de Mup1 y su llegada a la vacuola. Ante este estímulo de metionina, la permeasa Mup1 se mantendría estable en la membrana plasmática. En el caso de existir interacción entre Mup1 y Art2, observaríamos los mismos resultados.

Sólo se obtuvieron resultados positivos en el caso del mutante *art1*, como se observa en la figura 4.11 donde se confirma la interacción descrita en la literatura (Lin et al, 2008; Nikko and Pelham, 2009). Cuando las células son transferidas de un medio SCD a un medio mínimo SD (sin metionina) durante 4h, Mup1 se localiza correctamente en la membrana para ejercer su función, tanto en células WT como en el mutante *art1* y *art2*. Sin embargo, mientras que un exceso de metionina durante 30

minutos origina la internalización de Mup1 en células WT y células *art2*, no ocurre lo mismo cuando Art1 está ausente. En esta cepa Mup1 permanece en la membrana, evidenciándose la interacción.

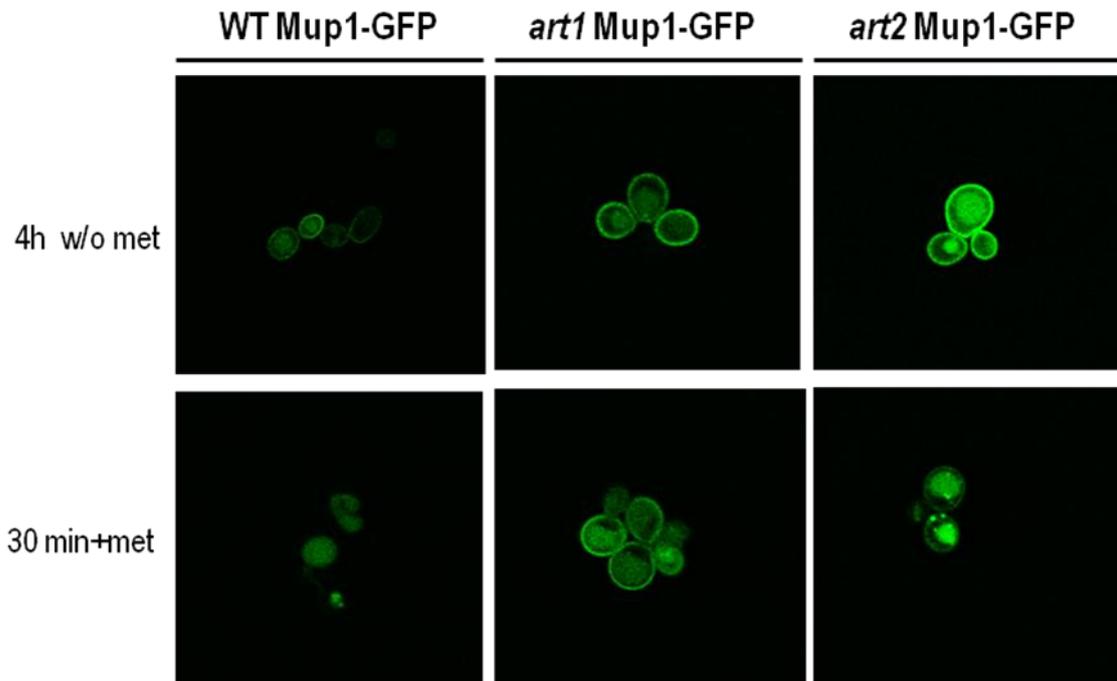
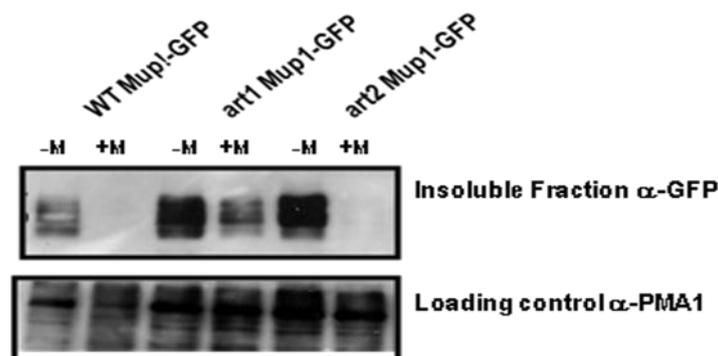


Figura 4.11. Acumulación del transportador Mup1 en la cepa silvestre, *art1* y *art2* del fondo genético BY4741 Las cepas indicadas fueron crecidas en un medio SCD suplementado con KCl 0.1M hasta fase logarítmica. Posteriormente estas células fueron lavadas con agua estéril y transferidas a un medio SD, sin metionina, suplementado con KCl durante 4h, tras lo cual, se añadió al medio un suplemento de metionina de 20 µg/ml. Ambas situaciones se analizaron por microscopía confocal. Se han mostrado las imágenes más representativas de cada situación

Estos resultados se confirmaron por análisis western blot donde se analizaron las fracciones solubles e insolubles de los extractos proteicos. Como se observa en la figura 4.12 panel A donde se analizó la fracción insoluble en ausencia y presencia de metionina, sólo en el caso del mutante *art1*, Mup1 permanece estable en la membrana tras la adición de metionina durante 30 minutos. Respecto a su contenido vacuolar que viene representado por la fracción soluble (figura 4.12 panel B), la variación es mucho menor a la observada en los casos donde no hay interacción, véase WT y mutante *art2*, donde el contenido vacuolar de GFP aumenta considerablemente en medio con metionina. Estos resultados indican que Mup1 está siendo endocitado gracias a la acción de Art1, mientras que Art2, no juega ningún papel en estos procesos de endocitosis.

A)



B)

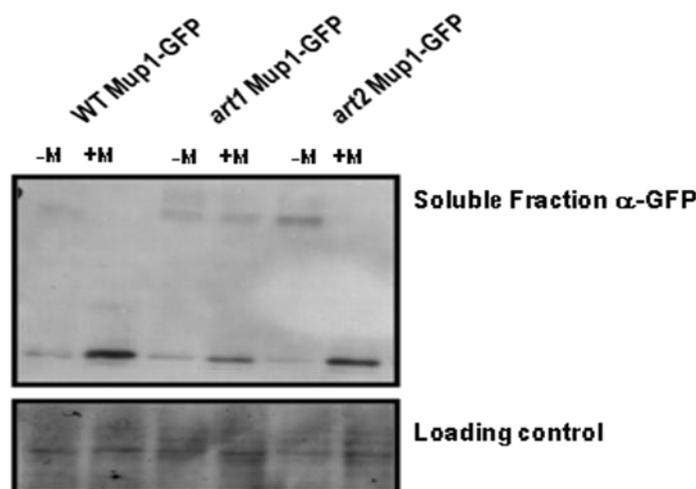


Figura 4.12. Análisis Western de la proteína Mup1 en la muestra fraccionada de las cepas indicadas. Las proteínas de la fracción insoluble (panel A) y de la fracción soluble (panel B) se aislaron en las cepas indicadas expresando un plásmido de la fusión Mup1-GFP y tratadas como se ha descrito en las figuras anteriores. La cantidad de Mup1 se analizó utilizando el anticuerpo anti-GFP y la cantidad de proteína presente en cada muestra se muestra en la membrana teñida con *direct blue* en el panel inferior.

Podemos decir a la vista de los resultados que Art1 se une específicamente a su *cargo* Mup1 ante un estímulo de metionina, desencadenando su endocitosis dependiente de Rsp5.

Este mismo experimento se realizó con otros mutantes como *gcn2*, *npr1*, *bmh1* y *bmh2*, por la literatura descrita hasta el momento, que postulaba algún tipo de interacción física, genética, etc. entre ellos y esta permeasa de metionina Mup1, sin ningún éxito en los resultados. (Datos no mostrados).

5. Estudio del triple mutante *hal4 hal5 art1*

En este trabajo hemos obtenido varios resultados en relación a la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1. Por un lado hemos observado que una cepa sin los genes de halotolerancia *HAL4* y *HAL5*, y en ausencia de un suplemento de KCl, sufre una desestabilización de Mup1 en la membrana plasmática. Por lo tanto, podemos decir que estas proteínas quinasas Hal4 y Hal5 están involucradas en la modulación del tráfico de esta proteína de la membrana plasmática, aunque, en este caso, se desconoce el responsable de la internalización de Mup1 en la vacuola.

Por otra parte, hemos observado que la endocitosis de Mup1, ante un estímulo de metionina, está regulada por el miembro de la familia de las arrestinas “ARTs” Art1. Además muchas de las otras permeasas que se ha descrito que sufren un defecto en su tráfico en el mutante *hal4 hal5*, como Can1, Fur4, Tat2 y Lyp1, son *cargos* de Art1 (Lin *et al.*, 2008; Nikko and Pelham, 2009)

Ante estos resultados, planteamos la propuesta de que el encargado de la internalización de Mup1 y quizás otras permeasas, en una cepa doble mutante *hal4hal5* fuera el adaptador Art1.

Para estudiar esta posibilidad generamos la cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*, como viene detalladamente descrito en materiales y métodos. La hipótesis planteada consistía en que ante un ayuno de KCl, donde en ausencia de *HAL4* y *HAL5*, se desencadena la internalización de Mup1 en la

vacuola, si Art1 fuera el responsable de dicha internalización, en una cepa *hal4 hal5 art1*, observaríamos que esta ausencia de Art1 evitaría la endocitosis de Mup1, que permanecería estable en la membrana plasmática.

Para comprobar la hipótesis, se cultivaron las células en medio mínimo suplementado con KCl 0,1M, hasta fase logarítmica y se observaron al microscopio confocal. Como se observa en la figura 4.13, en dichas condiciones, Mup1 permanece estable en la membrana plasmática, como era de esperar, puesto que las células no han sido sometidas a ningún estímulo, confirmándose todos los ensayos realizados hasta el momento. Sin embargo, tras lavar las células y someterlas durante dos horas a un ayuno de potasio, se observó una clara localización vacuolar de Mup1. Estos resultados desbancan nuestra hipótesis de que Art1 sea el encargado de mediar la ubiquitinación por Rsp5 del transportador Mup1.

Cabe destacar que ambos efectos estudiados, son dos efectos que suceden ante estímulos distintos, y que harán falta experimentos adicionales actualmente en marcha para comprobar nuestra hipótesis.

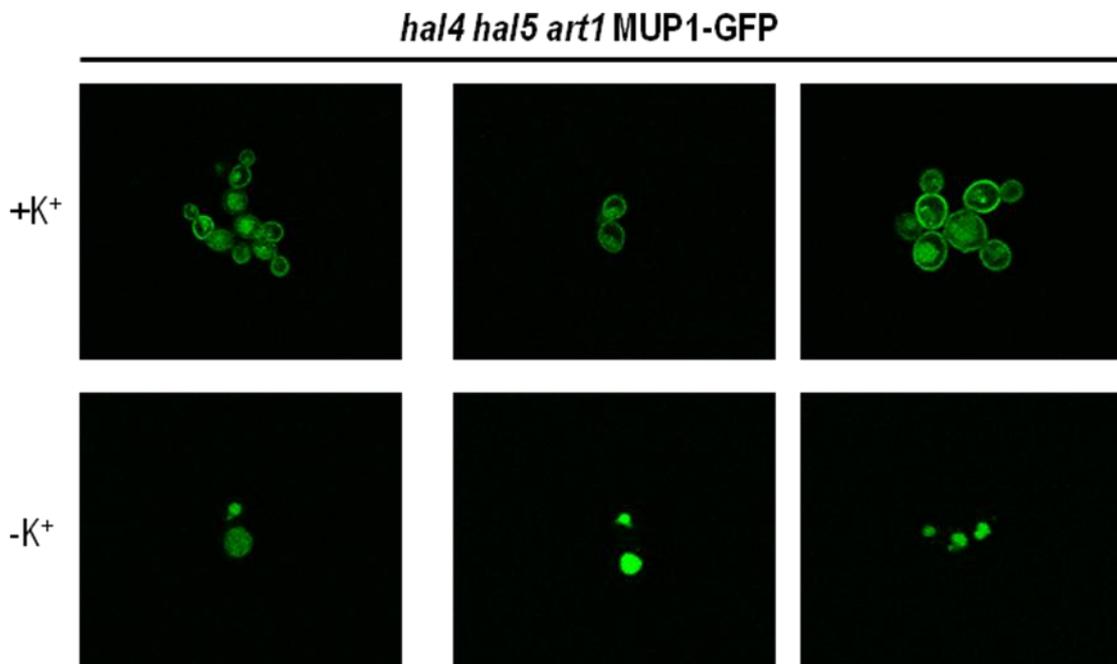


Figura 4.14. Localización de la proteína Mup1 en la cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*. La cepa indicada fue transformada con el plásmido que expresa la fusión GFP con la proteína Mup1, crecida hasta fase logarítmica en un medio suplementado con KCl 0.1M, incubadas en medio mínimo con o sin suplemento de potasio durante 2 horas y analizadas por microscopía confocal. Se ha mostrado la imagen más representativa de cada situación.

Aunque se ha visto que los genes *HAL4* y *HAL5* tienen un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad de Mup1 en la membrana plasmática, Art1 no parece ser el encargado de mediar su internalización en la vacuola. Ello nos puede estar sugiriendo que, las proteína quinasas Hal4 y Hal5 pudieran estar implicadas en otro mecanismo diferente de regulación de los transportadores de la membrana plasmática independiente de los ARTs.

Discusión

DISCUSION

Hay distintas evidencias previas que sugieren que las proteína quinasas Hal4 y Hal5 son reguladores positivos necesarios para el funcionamiento normal del sistema de transporte de potasio TRK. Se ha observado que el mutante *hal4 hal5* no crece en medio con niveles bajos de potasio, y que tiene niveles más bajos de toma de rubidio (análogo del potasio) que la cepa silvestre, próximos a los del mutante *trk1trk2*. Por otra parte, también se ha visto que la sobre-expresión de *HAL4* y *HAL5* solo confiere tolerancia a sodio y a litio en células que expresan los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 (Mulet *et al.*, 1999)

En el laboratorio, se ha tratado de estudiar la interacción directa entre las proteína quinasas Hal4 y Hal5 y el sistema de transporte de potasio TRK utilizando varias aproximaciones experimentales, pero sin obtener ningún resultado concluyente.

Ante la dificultad de identificar algún tipo de interacción entre las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 con el sistema de transporte de potasio TRK se inició un análisis exhaustivo de los distintos fenotipos del mutante *hal4hal5*, con el objetivo de caracterizar el modo de interacción entre el sistema TRK y Hal4 y Hal5.

Antes del comienzo del presente trabajo, se intentó también encontrar interacciones entre Hal4 y Hal5 y otras proteínas mediante aproximaciones genéticas. Se ensayó la tolerancia a sal mediada por la sobreexpresión de *HAL4* o *HAL5* en varios mutantes. La hipótesis fue que, igual que se ha descrito en el caso del mutante *trk1 trk2*, al sobre-expresar las quinasas en una cepa que carece del gen que codifica un posible sustrato, no se observaría el fenotipo de halotolerancia (Mulet *et al.*, 1999). Se seleccionaron como candidatos mutantes en genes que codifican para proteínas que se ha descrito que interaccionan físicamente con Hal4 o con Hal5 (*SGD project. "Saccharomyces Genome Database"* <http://www.yeastgenome.org/>, 2008), así como proteínas que participan en la internalización de algunas proteínas de la membrana plasmática. Sin embargo, no se han encontrado indicios de interacción genética entre Hal4 y Hal5 con ninguna de estas proteínas; la sobre-expresión de las quinasas aportó tolerancia a LiCl en todos los mutantes analizados (datos no mostrados).

Como abordaje adicional para el estudio de los distintos fenotipos del mutante *hal4 hal5* se llevó a cabo un análisis en profundidad de su transcriptoma. Se han comparado los perfiles de transcripción de la cepa silvestre y del mutante *hal4 hal5* en dos fondos genéticos distintos, el W303 y el BY4741.

En todos estos experimentos realizados que han servido como base para el presente estudio, se ha observado que en el mutante *hal4 hal5* se produce un mayor acumulo de mensajeros de genes relacionados con el metabolismo energético y con la biosíntesis de metionina que en la cepa silvestre.

En este trabajo se comprobó que el mutante *hal4 hal5* presenta, en comparación con la cepa silvestre, bajos niveles de toma de metionina. Probablemente, estos bajos niveles de toma justifican el aumento en la transcripción de los genes relacionados con la biosíntesis de metionina, como medida para compensar el posible déficit de este aminoácido originado por los problemas en el transporte.

Se ha observado también en el mutante *hal4 hal5* una mayor acumulación de mensajeros relacionados con el metabolismo energético. Más concretamente, se ha encontrado una sobre-representación de mensajeros relacionados con la biosíntesis de ATP, el metabolismo aeróbico y el

transporte de electrones. El hecho de que haya un acumulo de mensajeros de genes relacionados con estas categorías funcionales en el mutante *hal4 hal5* podría estar reflejando alguna alteración en los niveles del metabolismo aeróbico. Para corroborar esta hipótesis, en el presente trabajo se midió el consumo de glucosa así como la producción de etanol en cepas que carecen de estos genes de halotolerancia observándose una reducción del flujo glucolítico, lo cual podría explicar esta inducción del metabolismo respiratorio con el objetivo de mejorar la producción energética celular. Además, en estudios previos se había observado una deslocalización del transportador de glucosa de baja afinidad Hxt1 en ausencia de potasio en el mutante *hal4 hal5*, lo que apoyaba esta hipótesis. Los niveles de actividad de la succinato-deshidrogenasa (SDH) son mucho más altos en el mutante que en la cepa silvestre, lo que podría estar reflejando este desplazamiento del metabolismo energético hacia la respiración.

Por otra parte, hay dos grupos de genes que se acumulan en mayor proporción en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre, pero sólo en uno de los dos fondos genéticos estudiados, el W303. En este fondo genético, en el mutante *hal4 hal5* también se acumulan mensajeros relacionados con las categorías funcionales de metabolismo de carbohidratos y respuesta a estrés que en la cepa silvestre. La mayor acumulación de mensajeros relacionados con el metabolismo de carbohidratos podría ser el reflejo de un estado de ayuno más generalizado en el mutante *hal4 hal5*. Ya se ha descrito como este mutante presenta dificultades en la toma de varios aminoácidos del medio. Podría estar teniendo también dificultades en la toma de otros nutrientes, como azúcares, y como consecuencia de ello se estaría produciendo un aumento en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos para optimizar su utilización por parte de la célula.

El análisis transcriptómico también ha revelado que en el mutante *hal4 hal5* los mensajeros relacionados con las categorías funcionales de biosíntesis de adenina y metabolismo de aminoácidos están presentes en menor proporción que en la cepa silvestre. Probablemente, como medida de ahorro energético, en las células del mutante se está produciendo una represión los genes relacionados con la biosíntesis de adenina. Podría ser que estuviera sucediendo también algo parecido con los genes responsables del catabolismo de aminoácidos. La mayor parte de los genes que se han seleccionado como reprimidos en el mutante *hal4 hal5* relacionados con el metabolismo de aminoácidos son genes catabólicos. Probablemente, ante las dificultades que tiene el mutante para tomar aminoácidos del medio se esté produciendo una represión del catabolismo de aminoácidos, como medida para lograr un mejor aprovechamiento de los nutrientes disponibles.

Todos estos datos apuntan hacia la posibilidad de que el mutante *hal4 hal5* este sufriendo un ayuno más generalizado, y que su único problema no sea los bajos niveles intracelulares de potasio ocasionados por la baja actividad del sistema de transporte de potasio de alta afinidad TRK.

En otro trabajo previo del laboratorio se había descrito el papel que desempeñan las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de la estabilidad de distintos transportadores de la membrana plasmática.

Se había visto también que a pesar de que el mutante *hal4 hal5* no presenta ningún defecto a nivel estructural en la membrana plasmática durante el ayuno de potasio, ya que se ha visto que la localización de la proteína estructural Sur7 es completamente normal en estas condiciones, la estabilidad de otras proteínas transportadoras de la membrana plasmática como Can1 (arginina), Fur4 (uracilo), Gap1 (aminoácidos), y Hxt1 (glucosa) presentan deslocalizaciones similares a las observadas para Trk1 (Perez-Valle *et al.*, 2007). Por ello se consideró la posibilidad de que el

defecto observado en la toma de metionina en el doble mutante *hal4 hal5*, sea debido a una deslocalización de la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1. Se pudo observar por microscopía confocal que en efecto, con bajas concentraciones de potasio en el medio, Mup1 se localiza en la vacuola. Estos datos llevan a la teoría de que el hecho de que en el mutante *hal4 hal5* existan varios transportadores de nutrientes que no son estables en la membrana plasmática pueda ser la causa que explique todos los fenotipos de ayuno observado, y que, como se ha comentado en el apartado anterior, quizás no puedan explicarse sólo por las bajas concentraciones intracelulares de potasio originadas por los bajos niveles de actividad del sistema TRK en este mutante.

Con respecto a esto, es interesante destacar que las quinasas Hal4 y Hal5 también parecen tener un papel en la regulación de la estabilidad de Mup1 en la membrana. Sin embargo, esto nos plantea la pregunta de si estas quinasas Hal4 Hal5 también estarán implicadas en la llegada de las permeasas a la membrana plasmática, y como abordaje inicial, en la acumulación específicamente de la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1 en dicha membrana.

El conocimiento acerca de las rutas y los participantes implicados en la ruta del ER-Golgi, y el tráfico Golgi-vacuola es muy amplio, sin embargo el conocimiento acerca de las rutas Golgi-superficie celular es muy escaso. Existen referencias acerca de que los *cargos* exocíticos se transportan a la membrana plasmática por al menos dos rutas, que implican dos poblaciones de vesículas con diferentes densidades, y que portan diferentes tipos de *cargos* (Harsay and Bretscher, 1995). Por ejemplo, algunos *cargos* como la ATPasa de la membrana plasmática parece ser que se empaquetan directamente en vesículas secretoras de baja densidad (LDSV), las cuales parten del aparato de Golgi, mientras que otros *cargos* como la fosfatasa ácida parecen ser transportadas desde el aparato de Golgi hacia un compartimento endosomal, para después ser empaquetados en vesículas secretoras de alta densidad (HDSV) (Gurunathan et al. 2002; Harsay and Schekman 2002). También fue demostrado recientemente que al menos una parte de la vía secretora atraviesa el endosoma antes de alcanzar la membrana plasmática, aunque no está todavía claro si la mayoría de transportadores de la membrana plasmática son empaquetados directamente en vesículas LDSV, como Pma1, o si ellos pasan por los endosomas en su camino hacia la membrana plasmática. Tampoco se conocen los mecanismos, ni los protagonistas de la regulación de todo este proceso.

Para responder a la pregunta de si las quinasas Hal4 y Hal5 están implicadas en la acumulación de Mup1 en la membrana, se estudió la localización de Mup1 en una situación de ayuno de metionina, donde se ha observado que en células WT, Mup1 se acumula en la membrana con el objetivo de tomar metionina del medio extracelular. Cuando se estudió dicha situación en el doble mutante *hal4 hal5*, se observó que en presencia de KCl, Mup1 no puede acumularse en la membrana. Este defecto parece incluso mayor en condiciones de ayuno de potasio. Todo esto parece indicar que el doble mutante *hal4 hal5* presenta también un defecto en la acumulación de Mup1 en la membrana plasmática y que quizás las quinasas Hal4 y Hal5 también estén implicadas en la regulación del la llegada y/o el reciclaje de Mup1 hacia la membrana plasmática, apoyando también el fenotipo de ayuno de metionina observado. Puesto que el doble mutante presenta otros fenotipos de ayuno como de aminoácidos, glucosa etc., como futuro objetivo planteamos estudiar la localización de otras permeasas cuya estabilidad en la membrana está regulada en condiciones de ayuno de potasio por las quinasas Hal4 y Hal5 como Can1, Fur4, Hxt1, y Gap1, en condiciones de ayuno de arginina, uracilo, glucosa o aminoácidos en ausencia y presencia de potasio en el medio, con el fin de comprobar si estas quinasas también están implicadas, de un modo más general, en la regulación de la acumulación de estas permeasas en la membrana.

Como se ha comentado en la introducción, existen una serie de moléculas llamadas Arrestin Related Trafficking Proteins (ARTs) que actúan reclutando a la ubiquitin ligasa, Rsp5, y regulando así la endocitosis de ciertos transportadores de la membrana plasmática. Para la interacción directa de los dominios WW (Trp-Trp) de la proteína Rsp5 es necesario que la proteína con la que esta vaya a interaccionar posea los denominados motivos PY, sin embargo, no todas las proteínas los poseen, siendo necesaria la intervención de otras proteínas adaptadoras, en este caso proteínas llamadas ARTs. Se ha visto en otros transportadores de la membrana plasmática como en los casos de el transportador de lisina, Lyp1, el transportador de arginina, Can1, o el transportador de metionina, Mup1, que carecen de motivos PY en su dominio citosólico N-terminal (necesario para su regulación) (Lin, *et al.*, 2008). Por ello estos necesitan de la ayuda de los ARTs, específicamente Art1 y Art2 para el reclutamiento de la ubiquitin ligasa Rsp5 y para su posterior degradación en la vacuola. Se sabe que Art1 y Art2 son reclutadas hacia la membrana plasmática en respuesta a diferentes estímulos como una alta concentración de un sustrato concreto o en respuesta a un estrés, pero se desconoce cómo son capaces de reconocer los dominios citosólicos N-terminales de transportadores de membrana específicos para unirse a ellos y regular de este modo su abundancia en la membrana plasmática. Una de las hipótesis sugiere que esta interacción, entre el ART y el dominio citosólico N-terminal del transportador, está gobernada por la fosforilación de determinados residuos de dicho dominio N-terminal de los transportadores o las propias ARTs, suponiendo esta modificación post-traducciona, una señal necesaria para el reconocimiento específico entre el ART y el transportador.

En el caso de la permeasa Mup1, aunque se había descrito que interaccionaba con Art1 específicamente ante un estímulo de metionina (Lin *et al.*, 2008), se desconocía cuales eran los residuos responsables de originar dicha interacción entre el adaptador y la permeasa. Tampoco había sido descrita si esta interacción era específica para Art1, o si este papel era redundante en algún otro miembro de la familia ART. Con el fin de esclarecer dichos interrogantes en los mecanismos de regulación de la endocitosis de la permeasa de metionina y basándonos en los resultados de Charles. H Lin y colaboradores (2008) donde habían observado que los dominios de interacción de Can1 y Lyp1, con el adaptador Art1 se encontraba en el extremo N-terminal, decidimos realizar un ensayo de doble híbrido entre las 180 pb del fragmento citosólico correspondiente al extremo N-terminal de esta permeasa, y las posibles dianas Art1, Art2, Art3 y Art4. Los resultados fueron en todos los casos negativos. La explicación más probable al respecto es que los dominios de interacción, al menos en el caso de Art1 no se encuentren en las 180 pb del extremo N-terminal de este transportador de la membrana. En el caso de Art2, Art3 y Art4, es probable que no exista interacción con Mup1, aunque con nuestros datos no se puede descartar esta posibilidad aun. Otra explicación alternativa es que tengamos un problema técnico derivado del aislamiento de este extremo citosólico del resto de la proteína que de lugar a una pérdida del contexto molecular y por tanto de su capacidad de interacción con su respectivo adaptador.

Con el objetivo de solventar estas posibles limitaciones, realizamos ensayos genéticos en cepas WT, y en mutantes *art1* y *art2* que expresaban la proteína de fusión Mup1-GFP. Enunciamos la hipótesis de que en caso de interacción, la adición de metionina al medio, evitaría la internalización de Mup1 en la vacuola permaneciendo la permeasa estable en la membrana plasmática. Tal fue el caso para el mutante *art1*. De esta forma pudimos confirmar la interacción descrita en la literatura entre Art1 y Mup1, y pudimos estimar que al menos en el caso de Art2, no hay redundancia de función con Art1 en la adaptación de Mup1 para ser endocitado por la ubiquitin ligasa Rsp5.

Por otro lado, como ya hemos mencionado anteriormente, había sido descrito en otro trabajo de Perez-Valle que las quinasas Hal4 y Hal5 son imprescindibles en la regulación de la estabilidad de transportadores de la membrana plasmática como Trk1, Fur4, y Can1 posiblemente impidiendo modificaciones post-traduccionales, como la ubiquitinación (mediada por Rsp5), que conducen a la proteína a su degradación en la vacuola. En este trabajo hemos observado también que estas proteínas quinasas Hal4 y Hal5 son necesarias para la estabilidad del transportador Mup1 en la membrana plasmática, ya que en condiciones de ayuno de potasio y ante la ausencia de Hal4 y Hal5, Mup1 es endocitado y dirigido a la vacuola.

También hemos visto, como ha sido descrito en el párrafo anterior, que Art1 es el encargado de mediar la internalización de Mup1 y su transporte hacia la vacuola. Estos datos nos conducen a pensar que quizás el responsable de mediar la internalización en la vacuola del transportador Mup1 en una cepa mutante *hal4 hal5* que está sufriendo un ayuno de potasio sea el adaptador Art1. Con el pretexto de entender mejor el mecanismo por el cual estas quinasas regulan el transportador de metionina Mup1, construimos la cepa triple mutante *hal4 hal5 art1* esperando observar que si Art1, como hemos planteado, es el responsable de la desestabilización de Mup1 en una cepa que no posee los genes *HAL4* y *HAL5*, en una cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*, ante un ayuno de potasio, observaríamos como Mup1 se mantendría en la membrana plasmática. Los resultados indicaron que Mup1 se internaliza y se acumula en la vacuola en el mutante *hal4 hal5 art1*. Por tanto, parece ser que Art1 no participa en dicho proceso de endocitosis del transportador, sugiriendo que las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 pudieran estar implicadas en otro mecanismo diferente de regulación de los transportadores de la membrana plasmática, como a lo mejor un mecanismo semejante a la autofagia.

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado en todas las especies, donde se ha visto hasta ahora que los componentes citoplásmicos son secuestrados en unas vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas y liberados en los lisosomas para su degradación, en situaciones de privación de nutrientes como aminoácidos o glucosa. El objetivo de este mecanismo es la producción de energía, la gluconeogénesis o la nueva síntesis de proteínas (Kuma and Mizushima, 2010). También ha sido sugerido en la literatura que la ubiquitina podría ser una marca de los *cargos* ya no sólo para la degradación proteosomal si no también para la autogósomica (Kuma and Mizushima, 2010).

Respecto a estos varias son las evidencias que apuntan hacia un papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en un mecanismo semejante a la autofagia que afectarían a las proteínas de la membrana plasmática. Por ejemplo, se ha visto que en células WT privadas de alimentos, los niveles de expresión de ciertas proteínas que incluyen enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos son mayores, sin embargo la inducción de estas proteínas aparece severamente suprimida en mutantes de autofagia *atg* (Onodera and Ohsumi, 2005). Estos datos coinciden con nuestros datos del microarray donde aparece reprimida en el mutante *hal4 hal5* la categoría funcional de síntesis de aminoácidos. También hemos observado que ante una ausencia de los genes *HAL4* y *HAL5*, en ausencia de un suplemento de potasio, todos los transportadores de la membrana plasmática estudiados hasta el momento, Mup1, Can1, Fur4, Hxt1, Gap1, Trk1 son internalizados en la vacuola, lo cual parece responder a un mecanismo general ante este ayuno. Además, como observaciones indirectas, cabe destacar que los fenotipos observados para el mutante *hal4 hal5*, son fenotipos de ayuno, que encajan con las situaciones donde se ha descrito se inicia la autofagia.

Cabe destacar que aunque la autofagia inicialmente fue descrita como un proceso al azar que implica la degradación de porciones del citoplasma, actualmente se ha hecho evidente que la autofagia comprende múltiples formas de procesos relacionados donde la mayoría están implicadas en un transporte muy selectivo de los *cargos* a la vacuola, que quizás pudiese incluir *cargos* de la membrana plasmática. Además se ha observado una conservación muy reducida de proteínas selectivas Atg entre las distintas especies de levadura, por lo que no sería extraño que estas vías usaran proteínas diferentes a las identificadas en las especies de levadura y mamíferos (Kiel, 2010), como por ejemplo las quinasas Hal4 y Hal5.

Para estudiar esta hipótesis, como primer abordaje deberíamos observar que ocurre también con este triple mutante *hal4 hal5 art1* expresando otros transportadores como Can1, o Fur4 que se sabe que su internalización es dependiente de Rsp5 y está mediada por Art1. La obtención de resultados negativos con estos transportadores, apoyaría un papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en un mecanismo general semejante a la autofagia. Posteriormente deberíamos plantear un ensayo genético donde estudiar en una cepa triple mutante que además de tener mutadas las quinasas Hal4 y Hal5, también tuviese mutado algún elemento de la ruta autofágica Atg. Si en ausencia de estos tres genes y en condiciones de ayuno de potasio, nuestras permeasas permanecieran estables en la membrana ello podría estar sugiriendo un papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de la autofagia de proteínas de la membrana plasmática.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado en la realización de este trabajo se exponen a continuación:

1. El mutante *hal4 hal5* presenta niveles menores de consumo de glucosa y producción de etanol, así como niveles más altos de actividad succinato deshidrogenasa (SDH) que la cepa silvestre, lo que probablemente refleja un aumento del metabolismo aeróbico.

2. En el mutante *hal4 hal5*, en medio no suplementado con potasio, la cantidad de Mup1 presente en la membrana plasmática disminuye, y se produce un acumulo de señal (GFP) en el lúmen de la vacuola. Hal4 y Hal5 son necesarias para mantener los niveles de la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1 en la membrana plasmática, al igual que ocurre con otras permeasas de la membrana plasmática como la permeasa de arginina Can1, la permeasa de uracilo Fur4, el transportador de glucosa Hxt1 y la permeasa de aminoácidos Gap1, estableciéndose un mecanismo general de regulación.

3. El mutante *hal4 hal5* presenta en condiciones de ayuno de metionina un defecto en la acumulación de Mup1 en la membrana plasmática. Ello sugiere que las quinasas Hal4 y Hal5 también estén implicadas en la regulación de la llegada y/o el reciclaje de Mup1 hacia la membrana plasmática, apoyando también el fenotipo de ayuno de metionina observado.

4. En los ensayos genéticos hemos confirmado la interacción entre Mup1 y Art1 descrita en la literatura. Descartamos la redundancia de función entre Art1 y Art2 en la internalización de Mup1 ante un estímulo de metionina.

5. No se detecta la interacción entre el extremo N-terminal del transportador de la membrana Mup1 (pb 1-180) y Art1, Art2, Art3 y Art4, en el sistema de doble híbrido. Dada la interacción genética observada entre Mup1 y Art1, es posible que el contexto molecular del dominio de interacción de Mup1 sea importante, aunque no se puede descartar que el dominio se encuentre en otra región de la proteína o que dicha interacción sea indirecta.

6. Nuestros datos iniciales indican que Art1 no parece ser necesario para la internalización de Mup1 y su consiguiente llegada a la vacuola en una cepa carente de los genes *HAL4* y *HAL5*, en ausencia de un suplemento de potasio. Ello sugiere un papel novedoso de las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de la permeasa de metionina Mup1, y quizás otras permeasas de la membrana.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- Abe,F. and Iida,H. (2003). Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol. Cell Biol.* 23, 7566-7584.
- Alepuz,P.M., Cunningham,K.W., and Estruch,F. (1997a). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol. Microbiol.* 26, 91-98.
- Alvarez,C.E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC. Evol. Biol.* 8, 222.
- Andoh,T., Hirata,Y., and Kikuchi,A. (2002). PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. *FEBS Lett.* 525, 131-134.
- Andre,B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1575-1611.
- Arino,J., Ramos,J., and Sychrova,H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 95-120.
- Bagnat,M., Chang,A., and Simons,K. (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell* 12, 4129-4138.
- Bagnat,M., Keranen,S., Shevchenko,A., Shevchenko,A., and Simons,K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3254-3259.
- Bartel,P., Chien,C.T., Sternglanz,R., and Fields,S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924.
- Beck,T., Schmidt,A., and Hall,M.N. (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* 146, 1227-1238.
- Belgareh-Touze,N., Leon,S., Erpapazoglou,Z., Stawiecka-Mirota,M., Urban-Grimal,D., and Haguener-Tsapis,R. (2008). Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 791-796.
- Crabeel,M. and Grenson,M. (1970). Regulation of histidine uptake by specific feedback inhibition of two histidine permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 14, 197-204.
- Crespo,J.L., Daicho,K., Ushimaru,T., and Hall,M.N. (2001). The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 34441-34444.
- Cunningham,K.W. and Fink,G.R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 2226-2237.

- Darte,C. and Grenson,M. (1975). Evidence for three glutamic acid transporting systems with specialized physiological functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1028-1033.
- Durell,S.R. and Guy,H.R. (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K(+) channel. *Biophys. J.* 77, 789-807.
- Eraso,P., Mazon,M.J., and Portillo,F. (2006). Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 164-170.
- Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Forment,J., Mulet,J.M., Vicente,O., and Serrano,R. (2002). The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 36-40.
- Gaber,R.F., Styles,C.A., and Fink,G.R. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 8, 2848-2859.
- Garciadeblas,B., Rubio,F., Quintero,F.J., Banuelos,M.A., Haro,R., and Rodriguez-Navarro,A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 236, 363-368.
- Gits,J.J. and Grenson,M. (1967). Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Evidence for a specific methionine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 507-516.
- Goffeau,A. *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-546, 567.
- Gomez,M.J., Luyten,K., and Ramos,J. (1996). The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 157-160.
- Goossens,A., de La,F.N., Forment,J., Serrano,R., and Portillo,F. (2000). Regulation of yeast H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.* 20, 7654-7661.
- Grenson,M., Mousset,M., Wiame,J.M., and Bechet,J. (1966). Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 325-338.
- Gustin,M.C., Zhou,X.L., Martinac,B., and Kung,C. (1988). A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 242, 762-765.
- Haro,R., Garciadeblas,B., and Rodriguez-Navarro,A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291, 189-191.
- Harsay,E. and Bretscher,A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J. Cell Biol.* 131, 297-310.

- Hicke,L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-530.
- Hinnebusch,A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407-450.
- Hoppe,T., Matuschewski,K., Rape,M., Schlenker,S., Ulrich,H.D., and Jentsch,S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.
- Hurley,J.H. and Emr,S.D. (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 277-298.
- Jauniaux,J.C. and Grenson,M. (1990). GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur. J. Biochem.* 190, 39-44.
- Kiel,J.A. (2010). Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 365, 819-830.
- Ko,C.H. and Gaber,R.F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 4266-4273.
- Komada,M. and Kitamura,N. (2005). The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J. Biochem.* 137, 1-8.
- Kotliar,N., Stella,C.A., Ramos,E.H., and Mattoon,J.R. (1994). L-leucine transport systems in *Saccharomyces cerevisiae* participation of GAP1, S1 and S2 transport systems. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 40, 833-842.
- Krogan,N.J. *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Kuma,A. and Mizushima,N. (2010). Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 683-690.
- Kwon,H.M. and Handler,J.S. (1995). Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 465-471.
- Lamb,T.M., Xu,W., Diamond,A., and Mitchell,A.P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 1850-1856.
- Lauwers,E. and Andre,B. (2006). Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. *Traffic.* 7, 1045-1059.
- Lauwers,E., Erpapazoglou,Z., Haguenaer-Tsapis,R., and Andre,B. (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* 20, 196-204.

- Lin,C.H., MacGurn,J.A., Chu,T., Stefan,C.J., and Emr,S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-725.
- Marquez,J.A. and Serrano,R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* 382, 89-92.
- Matheos,D.P., Kingsbury,T.J., Ahsan,U.S., and Cunningham,K.W. (1997a). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 3445-3458.
- Menant,A., Barbey,R., and Thomas,D. (2006). Substrate-mediated remodeling of methionine transport by multiple ubiquitin-dependent mechanisms in yeast cells. *EMBO J.* 25, 4436-4447.
- Mendizabal,I., Rios,G., Mulet,J.M., Serrano,R., and de,L., I (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* 425, 323-328.
- Mendoza,I., Rubio,F., Rodriguez-Navarro,A., and Pardo,J.M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 8792-8796.
- Merchan,S., Bernal,D., Serrano,R., and Yenush,L. (2004). Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot. Cell* 3, 100-107.
- Mulet,J.M., Leube,M.P., Kron,S.J., Rios,G., Fink,G.R., and Serrano,R. (1999). A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell Biol.* 19, 3328-3337.
- Munson,A.M., Haydon,D.H., Love,S.L., Fell,G.L., Palanivel,V.R., and Rosenwald,A.G. (2004). Yeast ARL1 encodes a regulator of K⁺ influx. *J. Cell Sci.* 117, 2309-2320.
- Murguia,J.R., Belles,J.M., and Serrano,R. (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* 271, 29029-29033.
- Murguia,J.R., Belles,J.M., and Serrano,R. (1995). A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* 267, 232-234.
- Nakamura,T., Liu,Y., Hirata,D., Namba,H., Harada,S., Hirokawa,T., and Miyakawa,T. (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* 12, 4063-4071.
- Nelissen,B., De,W.R., and Goffeau,A. (1997). Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 113-134.
- Nikko,E. and Pelham,H.R. (2009). Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic.* 10, 1856-1867.

- Nikko,E., Sullivan,J.A., and Pelham,H.R. (2008). Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9, 1216-1221.
- O'Donnell,A.F., Apffel,A., Gardner,R.G., and Cyert,M.S. (2010). Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* 21, 3552-3566.
- Onodera,J. and Ohsumi,Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.* 280, 31582-31586.
- Peng,J., Schwartz,D., Elias,J.E., Thoreen,C.C., Cheng,D., Marsischky,G., Roelofs,J., Finley,D., and Gygi,S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21, 921-926.
- Perez-Valle,J., Jenkins,H., Merchan,S., Montiel,V., Ramos,J., Sharma,S., Serrano,R., and Yenush,L. (2007). Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell Biol.* 27, 5725-5736.
- Perez-Valle,J., Rothe,J., Primo,C., Martinez,P.M., Arino,J., Pascual-Ahuir,A., Mulet,J.M., Serrano,R., and Yenush,L. (2010). Hal4 and Hal5 protein kinases are required for general control of carbon and nitrogen uptake and metabolism. *Eukaryot. Cell* 9, 1881-1890.
- Pickart,C.M. and Fushman,D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 610-616.
- Posas,F., Camps,M., and Arino,J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13036-13041.
- Proft,M. and Serrano,R. (1999). Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell Biol.* 19, 537-546.
- Rios,G., Ferrando,A., and Serrano,R. (1997). Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 515-528.
- Rodriguez,M.S., Gwizdek,C., Haguenaer-Tsapis,R., and Dargemont,C. (2003). The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 4, 566-575.
- Rotin,D., Staub,O., and Haguenaer-Tsapis,R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J. Membr. Biol.* 176, 1-17.
- Rubenstein,E.M. and Schmidt,M.C. (2007). Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, 571-583.
- Schmidt,A., Hall,M.N., and Koller,A. (1994). Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol. Cell Biol.* 14, 6597-6606.
- Schuler,G.D., Altschul,S.F., and Lipman,D.J. (1991). A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins* 9, 180-190.

- Serrano,R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165, 1-52.
- Serrano,R. *et al.* (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress in plants. *J. Exp. Botany* 50, 1023-1036.
- Serrano,R., Ruiz,A., Bernal,D., Chambers,J.R., and Arino,J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* 46, 1319-1333.
- Soetens,O., De Craene,J.O., and Andre,B. (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.* 276, 43949-43957.
- Tate,J.J., Rai,R., and Cooper,T.G. (2006). Ammonia-specific regulation of Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase Npr1. *J. Biol. Chem.* 281, 28460-28469.
- Teis,D., Saksena,S., and Emr,S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* 15, 578-589.
- Umebayashi,K. and Nakano,A. (2003). Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* 161, 1117-1131.
- Van,B.D. and Andre,B. (2001). A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 389-398.
- Vandebol,M., Jauniaux,J.C., and Grenson,M. (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* NPR1 gene required for the activity of ammonia-sensitive amino acid permeases encodes a protein kinase homologue. *Mol. Gen. Genet.* 222, 393-399.
- Wang,G., Yang,J., and Huibregtse,J.M. (1999). Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell Biol.* 19, 342-352.
- Wiame,J.M., Grenson,M., and Arst,H.N., Jr. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol* 26, 1-88.
- Wieland,J., Nitsche,A.M., Strayle,J., Steiner,H., and Rudolph,H.K. (1995). The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* 14, 3870-3882.
- Wurgler-Murphy,S.M. and Saito,H. (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* 22, 172-176.
- Yashiroda,H., Kaida,D., Toh-e A, and Kikuchi,Y. (1998). The PY-motif of Bul1 protein is essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various stress conditions. *Gene* 225, 39-46.
- Yashiroda,H., Oguchi,T., Yasuda,Y., Toh,E., and Kikuchi,Y. (1996). Bul1, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 3255-3263.

- Yenush,L., Merchan,S., Holmes,J., and Serrano,R. (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell Biol.* 25, 8683-8692.
- Yenush,L., Mulet,J.M., Arino,J., and Serrano,R. (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* 21, 920-929.

Anexos

Hal4 and Hal5 Protein Kinases Are Required for General Control of Carbon and Nitrogen Uptake and Metabolism^{∇†}

Jorge Pérez-Valle,^{1‡} Jessica Rothe,¹ Cecilia Primo,¹ Mar Martínez Pastor,¹ Joaquin Ariño,²
Amparo Pascual-Ahuir,¹ José Miguel Mulet,¹ Ramón Serrano,¹ and Lynne Yenush^{1*}

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, CSIC, 46022 Valencia, Spain,¹ and
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular and Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma
de Barcelona, E08193 Bellaterra, Barcelona, Spain²*

Received 27 July 2010/Accepted 7 October 2010

The yeast protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 are required for the plasma membrane stability of the K⁺ transporter Trk1 and some amino acid and glucose permeases. The transcriptomic analysis presented here indicates alterations in the general control of the metabolism of both nitrogen and carbon. Accordingly, we observed reduced uptake of methionine and leucine in the *hal4 hal5* mutant. This decrease correlates with activation of the Gcn2-Gcn4 pathway, as measured by expression of the *lacZ* gene under the control of the *GCN4* promoter. However, with the exception of methionine biosynthetic genes, few amino acid biosynthetic genes are induced in the *hal4 hal5* mutant, whereas several genes involved in amino acid catabolism are repressed. Concerning glucose metabolism, we found that this mutant exhibits derepression of respiratory genes in the presence of glucose, leading to an increased activity of mitochondrial enzymes, as measured by succinate dehydrogenase (SDH) activity. In addition, the reduced glucose consumption in the *hal4 hal5* mutant correlates with a more acidic intracellular pH and with low activity of the plasma membrane H⁺-ATPase. As a compensatory mechanism for the low glycolytic rate, the *hal4 hal5* mutant overexpresses the *HXT4* high-affinity glucose transporter and the hexokinase genes. These results indicate that the *hal4 hal5* mutant presents defects in the general control of nitrogen and carbon metabolism, which correlate with reduced transport of amino acids and glucose, respectively. A more acidic intracellular pH may contribute to some defects of this mutant.

The proper regulation of cellular ion homeostasis is a fundamental requirement for all living organisms. During the last decades, much work has led to the molecular definition of many ion transport proteins. In this respect, the eukaryotic model organism, *Saccharomyces cerevisiae*, has been instrumental not only in the identification of founding members of many ion transporter and channel families but also in the cloning and/or characterization of heterologous transporters from both mammals and plants (e.g., see references 25 and 34). With the more recent elucidation of the structures of many channels and transporters, our knowledge regarding the molecular mechanisms of how several classes of these transport proteins function has increased considerably (reviewed in reference 3). However, in many cases, the posttranslational mechanisms by which these proteins are regulated in response to external stimuli are largely unknown.

We have studied the regulation of the major potassium transporter in yeast, Trk1, as a model protein. This transporter is largely responsible for maintaining internal potassium at

concentrations much higher than that normally found extracellularly (11). The activity of this transporter does not appear to be influenced by transcriptional mechanisms, as the levels of *TRK1* mRNA do not change significantly in response to potassium starvation or different ionic stresses (reviewed in reference 2). Therefore, the regulation of Trk1 is thought to be largely posttranslational. Evidence for phosphorylation-dependent regulation of Trk1 has been provided by reports showing that this transporter is phosphorylated *in vivo* and negatively regulated by the type 1-like protein phosphatases Ppz1 and Ppz2 (36, 37).

The identification of yeast halotolerance genes has defined many important regulators of ion homeostasis (10, 12, 19, 20). These genes were identified in a functional screening for genes that confer tolerance to toxic amounts of LiCl and NaCl upon overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. Among these genes, the structurally and functionally related Hal4 (also known as Sat4) and Hal5 kinases are proposed to regulate the high-affinity potassium transporter Trk1. This hypothesis is based largely on the growth characteristics of the *hal4 hal5* double mutant strain, which requires potassium supplementation for maximal growth and displays a marked defect in rubidium uptake (19). These results suggested that these kinases may regulate Trk1 by direct phosphorylation and thus play an opposing role to that of the Ppz1 and Ppz2 phosphatases. Despite much effort, no experimental evidence demonstrating a direct physical interaction or direct phosphorylation of Trk1 by these kinases has been generated. More recently, we reported that upon removal of potassium supplementation, Trk1

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, CSIC, 46022 Valencia, Spain. Phone: 34 96 387 9375. Fax: 34 96 387 7859. E-mail: lynne@ibmcp.upv.es.

‡ Present address: Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Spain.

† Supplemental material for this article may be found at <http://ec.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 15 October 2010.

TABLE 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains

Strain	Relevant genotype	Reference or source ^a
W303-1A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2,3, 112 trp1-1 ura3-1</i>	31
<i>trk1 trk2</i>	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	19
<i>hal4 hal5</i>	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i>	19
<i>hal4 hal5</i> [pHluorin] [YCp- <i>TRK1</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pYPGE15-pHluorin] [p414- <i>TRK1</i> -HA]	
<i>hal4 hal5</i> [pHluorin] [YCp- <i>TRK1Δ35</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pYPGE15-pHluorin] [p414- <i>TRK1Δ35</i> -HA]	
W303 [p180]	W303-1A [p180]	
<i>hal4 hal5</i> [p180]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p180]	
<i>trk1 trk2</i> [p180]	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i> [p180]	
BY4741	<i>MATa ura3-0 leu2-0 his3-1 met15-0</i>	Euroscarf
<i>hal4 hal5</i>	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i>	
BY4741 [YCp- <i>MUP1-GFP</i>]	BY4741 [pRS416- <i>MUP1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>MUP1-GFP</i>]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [pRS416- <i>MUP1-GFP</i>]	
BY4741 [pHluorin]	BY4741 [pYPGE15-pHluorin]	
<i>hal4 hal5</i> [pHluorin]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [pYPGE15-pHluorin]	
BY4741 [p180] [YCp- <i>LEU2</i>]	BY4741 [p180] [YCplac111]	
<i>hal4 hal5</i> [p180]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [p180]	

^a Unless otherwise specified, all strains used were generated in this work.

is quickly targeted to the vacuole and degraded in the *hal4 hal5* mutant. Moreover, this retargeting is not specific for Trk1; other nutrient transporters, such as the Can1 arginine permease, the Hxt1 glucose transporter, and the Fur4 uracil permease, also accumulate in the vacuole under the same conditions (24). These observations led to the hypothesis that the Hal4 and Hal5 kinases may have an indirect effect on the Trk1 potassium transporter.

The Hal4 and Hal5 kinases belong to a family of yeast kinases that includes Ptk2 and Npr1, both implicated in the regulation of plasma membrane transport proteins. Ptk2 has been implicated in the phosphorylation of a plasma membrane proton ATPase, Pma1, although the mechanism by which this phosphorylation event may regulate transporter activity is not yet determined (9). Npr1 has been proposed to be a target of the target of rapamycin (TOR) kinase pathway and to regulate the trafficking of several amino acid permeases, including Gap1, Bap2, and Tat2 (7, 15, 23, 27). In this case, Npr1-dependent phosphorylation is proposed to affect Rsp5-dependent ubiquitination of these permeases, thus influencing the amount of these proteins present in the plasma membrane.

In order to ascertain the extent of the effect of transporter mislocalization in this mutant, we have analyzed several physiological aspects of the *hal4 hal5* mutant, such as the global gene expression pattern under several experimental conditions, amino acid uptake, activation of the general control nondepressing (GCN) pathway, glucose consumption, cytosolic pH, and Pma1 H⁺-ATPase activity. These analyses have revealed a general role for the Hal4 and Hal5 kinases in the uptake of both amino acids and sugar, thus influencing the proper control of nitrogen and glucose metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and culture conditions. All strains of *S. cerevisiae* used in this work are listed in Table 1. The BY4741 strain lacking *HAL4* and *HAL5* was constructed by disrupting *HAL5* in the *hal4* background obtained from the Euroscarf collection using the *LEU2* disruption cassette described previously (19). YPD medium contained 2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract. In the case of the acidified YPD medium (that with a pH of 4.5 [here designated YPD pH 4.5 medium]), 50 mM succinic acid was also added. Minimal medium (synthetic defined medium) contained 2% glucose, a 0.7% yeast nitrogen base

(Difco) without amino acids, 50 mM succinic acid adjusted to pH 5.5 with Tris, and the amino acids and purine and pyrimidine bases required by the strains. Growth assays were performed with solid media by spotting serial dilutions of saturated cultures onto plates with the indicated composition.

Plasmids used in this work. The *TRK1*-hemagglutinin (HA), *TRK1Δ35*-HA, and pYEp352-*HAL5* plasmids were previously described (24). The pYEP352-*HAL4* plasmid was constructed by inserting the *SacI/XbaI* genomic fragment containing the promoter and terminator sequences into the same sites in the pYEP352 vector. For the construction of the pYPGE15-pHluorin plasmid, the open reading frame (ORF) encoding a modified version of green fluorescent protein (GFP) called pHluorin (18) was amplified by PCR and cloned into the pYPGE15 vector using primer-derived *XhoI* sites. The correct orientation of the insert was then tested by *NdeI* digestion. The p180 plasmid, containing the *GCN4* promoter, was used for the β -galactosidase activity assays (35). The *MUP1-GFP* plasmid was used for confocal microscopy and Western blot analysis (29).

RNA labeling. Total RNA, obtained using standard phenol-chloroform extractions, was further purified using the CleanUp protocol of the RNeasy mini kit (Qiagen). Thirty micrograms of RNA was retrotranscribed in the presence of modified nucleotides [5-(3-amino-allyl)-2-deoxy-UTP] by using an oligo(dT) primer in order to copy mRNAs to single-strand modified cDNAs. cDNA synthesis was performed at 50°C during at least 3 h, using the reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen). The cDNA was then purified using Qiaquick (Qiagen) columns and labeled with Cy3 and Cy5 dyes, as recommended by the manufacturer (Amersham Biosciences). cDNAs were then purified again with Qiaquick (Qiagen) columns, and the labeling was confirmed by measuring the absorbance at the appropriate wavelength, using a Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific).

Microarray experimental design and hybridization. The chosen design for all the experiments was a balanced block design with four biological replicates and two dye swaps. The microarrays were generated at the Autonomous University of Barcelona Genomics Facility by spotting approximately 6,200 PCR-amplified yeast ORFs (1). For analysis, they were submerged for 45 min in a prehybridization solution (0.1% SDS, 5× SSC [1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate], 1% bovine serum albumin [BSA]) at 42°C. Microarrays were then hybridized with the labeled probes in hybridization solution (0.1% SDS, 5× SSC, 50% formamide, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA) using hybridization chambers (Telechem) overnight at 42°C. After the hybridization, microarrays were washed in different dilutions of SSC and SDS and then scanned to obtain digital images using a GenePix 4000B scanner (Axon Instruments) with a 10- μ m resolution.

Microarray data analysis. Digital images from microarrays were analyzed using the GenePix 4.0 (Axon Instruments) program. Only those genes whose intensity was 2-fold higher than local background intensity in at least one of the channels used were included in the analysis. The complete data set has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO; 8). The data from the four biological replicates were analyzed and normalized using the Acuity 4.0 program (Axon Instruments), and statistical selection of genes was performed

with the significance analysis application (SAM) (32). Genes were selected as differentially expressed when the expression in the mutant was at least 1.5-fold higher or lower than the expression in the wild type (WT) and, when applying the significance analysis (SAM), the false discovery rate (FDR) was lower than 5.5% (see Table S1 in the supplemental material). Relevant functional categories were selected using the Gene Ontology Term Finder as described previously (5). The YEASTRACT repository was searched in order to identify regulatory associations between the mRNAs induced in the *hal4 hal5* mutant and transcription factors responsible for this regulation (30).

Measurements of amino acid uptake. For methionine uptake measurements, the indicated strains were grown to exponential phase and collected by centrifugation (3,000 rpm for 5 min). After being washed with sterile water, cells were resuspended in 5 ml of buffer (50 mM succinic acid and 2% glucose [wt/vol]), either without or with 0.2 M KCl and incubated for 20 min at 28°C. The number of cells was determined for each culture, and methionine uptake assays were started by adding [¹⁴C]methionine (55 mCi/mmol; American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO) to a final concentration of 10 μM. Samples were collected at the indicated time points (Fig. 1A) by filtration on glass microfiber filters and dried overnight. Filters were then immersed in scintillation fluid, and the radioactivity was measured in counts per minute and disintegrations per minute by using the Pharmacia Wallac 1410 liquid scintillation counter as described previously (33). Methionine uptake is expressed as nmol of methionine per mg of cells (wet weight).

Leucine uptake measurements were performed as described for the methionine uptake protocols, but using [¹⁴C]leucine (315.5 mCi/mol; Amersham Biosciences).

Protein extraction and fractionation. Protein extracts, fractionation procedures, and Western blot analyses were performed as described previously (24).

Confocal microscopy. Fluorescence images were obtained as described previously (36).

β-Galactosidase assays. Yeast cells transformed with the indicated reporter plasmid (p180) were grown selectively in SD medium and then diluted in YPD pH 4.5 medium. In this case, the BY4741 strain was transformed with the YCplac111 (13) plasmid to match the strains for auxotrophies. Cells were grown to exponential phase and then harvested by centrifugation (3,000 rpm for 5 min). β-Galactosidase activity was determined as described elsewhere (12) and represented as β-galactosidase activity units. Data are the means from three independent transformants, each measured in triplicate.

Glucose consumption. Strains were grown in YPD pH 4.5 medium until mid-log phase. Cells were collected and resuspended in fresh media to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.2. At the indicated time points (see Fig. 4B), aliquots were removed to determine cell number and glucose concentration in the media using standard protocols employing coupled reactions with glucose oxidase (Roche) and horseradish peroxidase (Roche), with the diammonium salt of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid; Merck) as the chromophore. Error bars represent the standard deviations of triplicate determinations (see Fig. 4B). Identical results were observed in two independent experiments.

Ethanol production. Strains were grown in YPD pH 4.5 medium until mid-log phase (7×10^6 cells/ml). Cells were removed by centrifugation, and the amount of ethanol present in the media was determined by standard procedures for quantifying the production of NADH during the conversion of ethanol to acetaldehyde by alcohol dehydrogenase (Sigma) at 340 nm. The error bars represent the standard deviations of triplicate determinations (see Fig. 4C, right panel).

SDH assay. Mitochondrial-enriched extracts were prepared in TSB buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.6 M sorbitol), as described previously (21). Succinate dehydrogenase (SDH) assays were performed with *p*-iodonitrotetrazolium violet as an artificial electron acceptor for the SDH complex. Extracts were incubated in 300 μl of succinate buffer (10 mM succinic acid in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4) with 100 μl of *p*-iodonitrotetrazolium violet solution (2.5 mg of *p*-iodonitrotetrazolium violet in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4). The reactions were stopped with 1 ml of stop solution (10 g of trichloroacetic acid in 100 ml of ethyl acetate/ethanol; 1:1 [vol/vol]), and the absorbance of the supernatant was measured at 490 nm. Error bars represent the standard deviations of triplicate determinations (see Fig. 4C, left panel). Similar results were observed in two independent experiments.

Measurements of cytosolic pH. For the determination of the cytosolic pH, a modified version of GFP referred to as ratiometric pHluorin was employed (18). The strains of interest were transformed with YPGE15-pHluorin and grown to mid-log phase in SD medium with or without potassium supplementation (0.2 M KCl). Cells were then harvested, and cytosolic pH estimations and calibration curves were performed as previously described (6) using a PerkinElmer LS50B luminescence spectrometer equipped with FLWinLab software.

Measurement of H⁺-ATPase activity. The *in vitro* H⁺-ATPase activity was measured as described previously (14, 28).

Microarray data accession number. The complete data set has been deposited in NCBI's GEO database and is accessible through GEO series accession number GSE22976 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE22976>).

RESULTS

Transcriptomic analysis of the *hal4 hal5* mutant. As an approach to further investigate the biological roles of the functionally and structurally related Hal4 and Hal5 protein kinases, we compared the transcription profiles of the *hal4 hal5* double mutant and the wild-type strains in two different genetic backgrounds: W303-1A and BY4741. Both strains were grown to mid-log phase in YPD pH 4.5 medium. We initially chose this acidified rich medium based on the more severe growth defect displayed by the *hal4 hal5* mutant. Moreover, we wanted to compare the phenotypic differences between the wild-type and mutant strains under steady-state conditions.

Using the experimental design described in Materials and Methods, 709 genes were differentially expressed in the W303-1A genetic background (see Table S1 in the supplemental material). Of these genes, 457 had higher mRNA levels in the *hal4 hal5* mutant than in the wild type, whereas 252 transcripts accumulated to lower levels in the *hal4 hal5* mutant than in the wild type. In the BY4741 genetic background, the number of differentially expressed genes was smaller: 260. There were 194 genes whose expression was higher in the *hal4 hal5* mutant than in the wild type and 66 genes whose mRNA accumulated to lower levels in the *hal4 hal5* mutant than in the wild type (see Table S1 in the supplemental material).

Although the number of differentially expressed genes is considerably larger in the W303-1A genetic background than in the BY4741 genetic background, many of the same genes were identified in both genetic backgrounds. Approximately 70% (139 of 194) of the induced genes and 60% (40 of 66) of the repressed genes identified in the *hal4 hal5* mutant in the BY4741 genetic background were also identified in the W303-1A genetic background.

To characterize the biological processes represented by these genes, we employed the GO Term Finder tool (5). As shown in Table 2, among the genes induced in the *hal4 hal5* mutant in the BY4741 genetic background, two functional categories, related to energy metabolism and methionine biosynthesis, are significantly overrepresented (GO Term Finder *P* value, <0.01). In the W303-1A genetic background, where the number of induced genes was almost doubled, these two functional categories are also overrepresented among the induced genes, as were additional functional categories related to carbohydrate metabolism and stress response.

Among the genes repressed in the *hal4 hal5* mutant in the BY4741 genetic background, functional categories related to nucleotide metabolism (adenine biosynthesis), amino acid metabolism, and iron assimilation (three genes) are overrepresented. In the W303-1A genetic background, we also observed an overrepresentation of functional categories related to adenine biosynthesis and amino acid metabolism, but not those related to iron assimilation. On the other hand, in addition to the categories mentioned above, there is also an overrepresentation of genes related to the functional categories of ribosome biogenesis and ergosterol biosynthesis.

TABLE 2. Summary of functional categories of genes differentially regulated in the *hal4 hal5* mutant^a

Gene category	Functional categories for the indicated strain (growth medium)		
	W303-1A (YPD pH 4.5)	BY4741 (YPD pH 4.5)	W303-1A (YPD pH 6.0)
Induced genes	Energy metabolism <i>ATP biosynthesis</i> <i>Aerobic respiration</i> <i>Electron transport</i>	Energy metabolism <i>ATP biosynthesis</i> <i>Aerobic respiration</i> <i>Electron transport</i>	Energy metabolism <i>ATP biosynthesis</i> <i>Aerobic respiration</i> <i>Electron transport</i>
	Sulfate assimilation <i>Methionine biosynthesis</i>	Sulfate assimilation <i>Methionine biosynthesis</i>	Sulfate assimilation <i>Methionine biosynthesis</i>
	Carbohydrate metabolism <i>Trehalose biosynthesis</i> <i>Glycogen biosynthesis</i> <i>Alcohol catabolism</i> <i>Monosaccharide catabolism</i>		
	Stress response		
Repressed genes	Nucleotide metabolism <i>Adenine biosynthesis</i>	Nucleotide metabolism <i>Adenine biosynthesis</i>	Nucleotide metabolism <i>Adenine biosynthesis</i>
	Amino acid metabolism	Amino acid metabolism	Amino acid metabolism
	Ribosome biogenesis	Iron assimilation	
	Ergosterol biosynthesis		

^a Functional categories were identified using the Gene Ontology Term Finder available through the *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>). Categories with a *P* value of <0.01 were considered significant. Relevant subcategories are shown in italics.

It is worth noting that these experiments have been performed for genetic backgrounds with different genotypes in terms of adenine and methionine auxotrophies. The W303-1A genetic background is *ade2 MET15*, whereas the BY4741 genetic background is *ADE2 met15*. Therefore, the identification of differentially expressed genes related to methionine and adenine biosynthesis is not due to the genetic background of the strain employed. In addition, we performed Northern blot analyses to confirm the induction and repression of selected genes by comparing the W303-1A *hal4 hal5* mutant to a control strain in which we introduced the wild-type versions of both *LEU2* and *HIS3* by homologous recombination to match the auxotrophies (data not shown).

Moreover, we performed the same experiment using cells from the W303-1A genetic background grown in YPD pH 6.0 medium (see Table S1 in the supplemental material). Under these conditions, the functional categories that were overrepresented among the induced and the repressed genes were exactly the same as those that were identified in both genetic backgrounds when cells were grown at pH 4.5 (for induced genes, energy metabolism and methionine biosynthesis; for repressed genes, adenine biosynthesis and amino acid metabolism).

Thus, these results suggest that strains lacking the *HAL4* and *HAL5* genes display alterations in the general control of both nitrogen and carbon uptake and/or metabolism.

Nitrogen uptake/metabolism. (i) Methionine and leucine uptake are decreased in the *hal4 hal5* mutant. The functional

category of methionine biosynthesis was overrepresented among the genes induced in the *hal4 hal5* mutant under all conditions tested. Virtually all the genes involved in the biosynthesis of methionine are induced in the *hal4 hal5* mutant in at least one of the experiments described (see Fig. S1 in the supplemental material). We reasoned that a defect in methionine uptake in this mutant could explain the observed induction of these genes. In order to test this hypothesis, methionine uptake assays were performed for both the *hal4 hal5* mutant and wild-type strains. Cells were grown to exponential phase in YPD pH 4.5 medium in order to maintain the same conditions as those in the transcriptomic analysis. As shown in Fig. 1A, the *hal4 hal5* mutant displays a marked decrease in the maximum methionine uptake after 10 min (around 50% of the maximum methionine uptake observed for the wild type) and also a lower initial uptake velocity.

In order to determine if the defect in methionine uptake was due to mislocalization of the Mup1 high-affinity methionine permease, we analyzed the localization of a Mup1-GFP fusion protein in wild-type and *hal4 hal5* strains. As shown in Fig. 1B, reduced amounts of Mup1-GFP are observed in the plasma membrane of the *hal4 hal5* mutant, whereas GFP accumulates in the vacuole of these strains in both the presence and the absence of K⁺ supplementation of the growth media. We confirmed these results by anti-GFP Western blot analysis of fractionated protein extracts, observing a reduction in the Mup1-GFP signal in the plasma membrane-containing insoluble fraction and an increase in free GFP in the soluble fraction

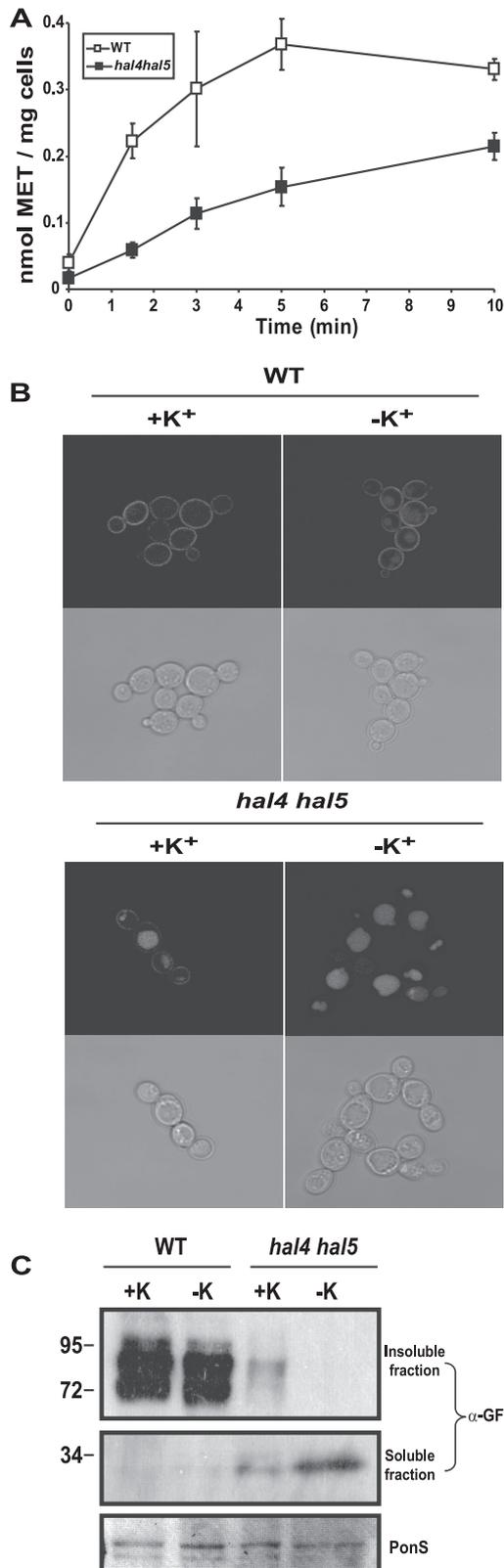


FIG. 1. Methionine uptake is reduced in the *hal4 hal5* mutant. (A) The indicated strains (W303 background) were grown to exponential phase in YPD pH 4.5 medium. Cells were harvested and used for methionine uptake assays as described in Materials and Methods. Graphs show the median value and the standard deviation from three independent experiments. Data are shown in nmol of methionine per

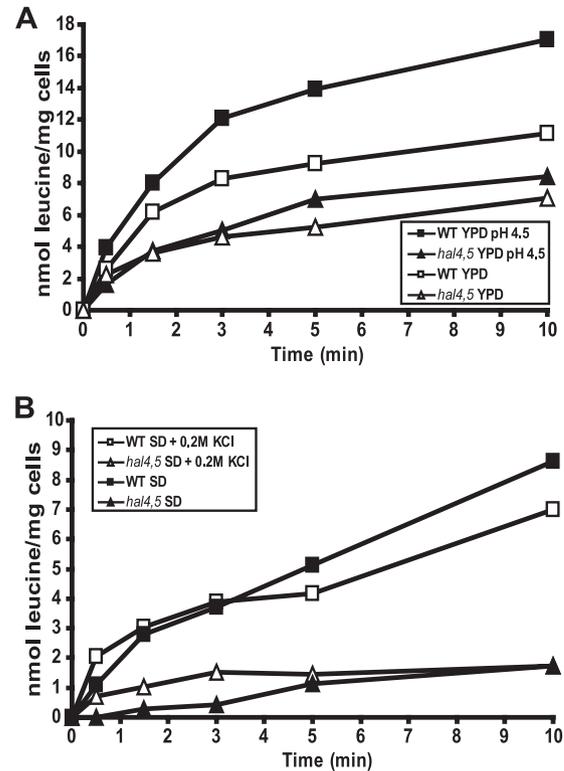


FIG. 2. Leucine uptake in the *hal4 hal5* mutant is reduced. (A) The indicated strains (BY4741 background) were grown to exponential phase. Cells were harvested and used for leucine uptake assays as described in Materials and Methods. Assays were performed with YPD pH 6.0 medium and YPD pH 4.5 medium. *hal4,5*, *hal4 hal5* mutant. (B) The indicated strains (BY4741 background) were grown to exponential phase in SD medium supplemented with 200 mM KCl. Cells were harvested and washed with water. Cells were then incubated for 2 h in minimal media with (+0.2 M KCl) or without potassium supplementation and used for leucine uptake assays as described in Materials and Methods. Data are shown in nmol of leucine per mg of cells. Experiments were repeated at least three times, and the relative differences between strains and conditions were the same, although the absolute values varied. The graphs show the results from samples obtained and processed in parallel.

(which contains the contents of vacuolar lumen) in the *hal4 hal5* mutant (Fig. 1C).

In order to test whether this defect in amino acid uptake is specific to methionine or a more general effect, we also performed leucine uptake assays.

We observed a similar decrease in leucine uptake in the *hal4 hal5* mutant compared to that in the wild-type control (Fig. 2).

mg of cells. (B) The subcellular localization of Mup1-GFP was analyzed by confocal microscopy of the indicated strains grown to mid-log phase in K⁺-supplemented media (+K⁺) and after 2 h in low-K⁺ media (-K⁺). Representative images are shown. (C) The indicated strains, treated as in panel B, were processed for protein extraction and fractionation as described in Materials and Methods. The corresponding Western blots were analyzed with an anti-GFP (α -GFP) antibody. The image of a portion of the membrane stained with PonS is shown as a loading control. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa).

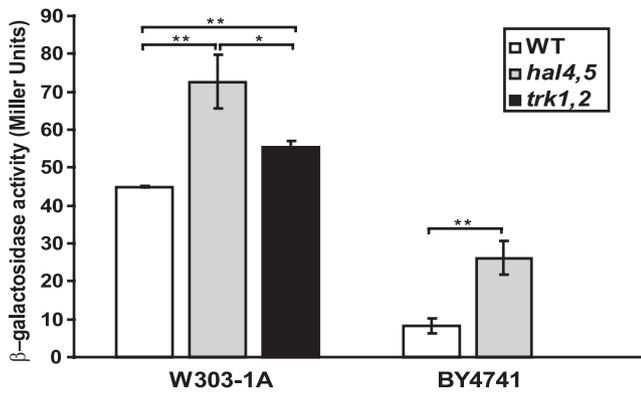


FIG. 3. GCN pathway activation in the *hal4 hal5* and *trk1 trk2* mutants. Cells of the indicated strains and background were grown in YPD medium to exponential phase and were harvested by centrifugation. β -Galactosidase activity was determined as described in Materials and Methods. Graphs show the median and the standard deviation from three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; *hal4,5*, *hal4 hal5* mutant; *trk1,2*, *trk1 trk2* mutant.

For consistency, these experiments were performed with YPD pH 4.5 medium. We extended these studies to examine leucine uptake in normal YPD medium and in minimal growth media with and without potassium supplementation. As shown in Fig. 2A and B, in all cases, the *hal4 hal5* mutant displayed a decrease in both the initial rate and total uptake during the time course analyzed. We also confirmed these results in an alternative genetic background (W303-1A) and using mutant and wild-type strains with equivalent auxotrophies (wild-type BY4741 strain transformed with a centromeric plasmid carrying the *LEU2* gene) (data not shown).

(ii) **GCN activity is increased in the *hal4 hal5* mutant.** The decrease in methionine and leucine uptake described for the *hal4 hal5* mutant may lead to a general state of amino acid starvation. In order to investigate this possibility, we measured the activity of the GCN pathway in this mutant. The Gcn4 transcriptional activator is regulated by a translational control mechanism that increases the cellular concentration of this transcription factor in amino acid-starved cells (reviewed in reference 17).

In order to analyze the activity of the GCN pathway, wild-type and *hal4 hal5* mutant strains were transformed with the p180 plasmid that contains a fusion of the *GCN4* promoter with the *lacZ* gene. Increased production of β -galactosidase is correlated with increased Gcn4 activity and is observed upon amino acid starvation (16). When cells were grown in rich medium (YPD), β -galactosidase activity was higher in the *hal4 hal5* mutant than in the wild type for strains of two different genetic backgrounds (Fig. 3 and data not shown). In the case of the BY4741 background, the wild-type control was cotransformed with a centromeric plasmid carrying the *LEU2* gene in order to eliminate differences in the auxotrophies. These results show that the *hal4 hal5* mutant has a constitutive activation of the GCN pathway, probably reflecting amino acid starvation in this mutant.

β -Galactosidase activity levels were also measured for the *trk1 trk2* mutant (W303-1A genetic background). We assayed this strain, which lacks the high-affinity potassium transporters,

in order to distinguish between those effects that are caused by the lack of high-affinity potassium transport from those that are directly caused by the absence of the Hal4 and Hal5 kinases. In the *trk1 trk2* strain, β -galactosidase activity levels were intermediate between those observed for the *hal4 hal5* mutant and those observed for the wild type (Fig. 3).

Carbon metabolism. (i) Mitochondrial activity is increased in the *hal4 hal5* mutant. Analysis of the transcriptomic data of the *hal4 hal5* mutant reveals the overaccumulation of mRNAs corresponding to groups of genes related to energy metabolism. For example, genes specifically related to the respiratory chain accumulated to higher levels in the *hal4 hal5* mutant than in the wild type (Fig. 4A). As reported above, this mutant displays a defect in both methionine and leucine uptake, which may reflect a more general starvation, one not only of amino acids but also of other nutrients, such as glucose. We previously reported a defect in the plasma membrane localization of the Hxt1 glucose transporter in the *hal4 hal5* mutant (24). Moreover, the high-affinity hexose transporter *HXT4* and three hexokinase genes, *HXX1*, *HXX2*, and *GLK1*, are induced in the *hal4 hal5* mutant. These results are consistent with a relative reduction in glucose uptake. Therefore, we measured glucose consumption in the wild type and the *hal4 hal5* mutant. As shown in Fig. 4B, the mutant strain consumes less glucose than the wild-type control. This reduction in glycolytic flux may explain the altered metabolic state of this mutant toward respiration in order to optimize energy production. Consistent with this hypothesis, we observed dramatically higher succinate dehydrogenase (SDH) activity and a reduction in ethanol production in the *hal4 hal5* mutant (Fig. 4C).

(ii) **The intracellular pH and Pma1 activity of the *hal4 hal5* mutant are decreased.** It has been proposed that alterations in potassium transport could affect intracellular pH due to the strict requirement of maintaining electrical neutrality in cells. We reported experimental evidence supporting this hypothesis by showing that the internal pH is increased in yeast mutants that aberrantly accumulate potassium (37). We hypothesized that the decrease in the intracellular potassium concentration observed for the *hal4 hal5* mutant (24) would lead to proton accumulation and consequent cytosolic acidification.

In order to analyze the cytosolic pH of the *hal4 hal5* mutant and the wild-type strain, both strains were transformed with a plasmid containing a modified version of GFP, referred to as ratiometric pHluorin, which changes its emission spectrum depending on the cytosolic pH of the cells (18).

As expected, we found that the *hal4 hal5* mutant (BY4741 genetic background) has a lower cytosolic pH than the control strain 2 h after transfer to minimal medium without potassium supplementation (6.47 ± 0.08 versus 6.91 ± 0.10 , respectively). Under these conditions, the *hal4 hal5* mutant displays a marked decrease in the internal potassium concentration (136 ± 7 mM for the WT versus 92 ± 8 mM for the *hal4 hal5* mutant) (24). Strikingly, when we performed the same analysis with these strains grown in potassium supplemented medium, with the *hal4 hal5* mutant and the wild-type strains having similar internal potassium concentrations (161 ± 11 mM versus 162 ± 18 mM), we observed that the *hal4 hal5* mutant retained a significantly lower cytosolic pH (6.79 ± 0.17 for the WT versus 6.46 ± 0.06 for the *hal4 hal5* mutant). These results were confirmed with an alternative genetic background (W303-

A

NADH Dehydrogenase	Succinate Dehydrogenase Complex	Cytochrome bc1 Complex	Cytochrome c Oxidase Complex	ATP Synthase Complex
<u>NDL1</u>	<u>SDH1</u> <u>SDH2</u> <u>SDH3</u> <u>SDH4</u>	<u>COR1</u> <u>CYT1</u> <u>QCR2</u> <u>QCR6</u> <u>QCR7</u> <u>QCR8</u> <u>QCR9</u> <u>RIP1</u>	<u>COX4</u> <u>COX5A</u> <u>COX5B</u> <u>COX6</u> <u>COX8</u> <u>COX9</u> <u>COX12</u> <u>COX13</u>	<u>ATP1</u> <u>ATP2</u> <u>ATP3</u> <u>ATP4</u> <u>ATP5</u> <u>ATP7</u> <u>ATP14</u> <u>ATP15</u> <u>ATP16</u> <u>ATP17</u> <u>ATP20</u> <u>TIM11</u> <u>INH1</u> <u>STF1</u> <u>STF2</u>

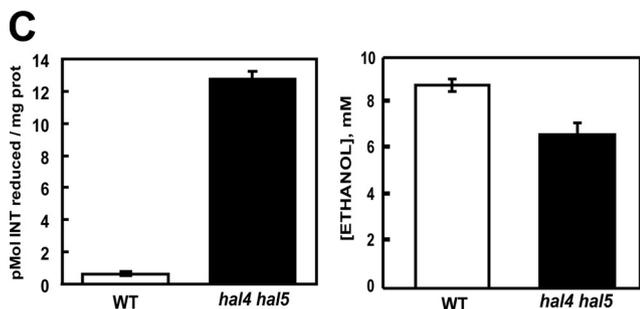
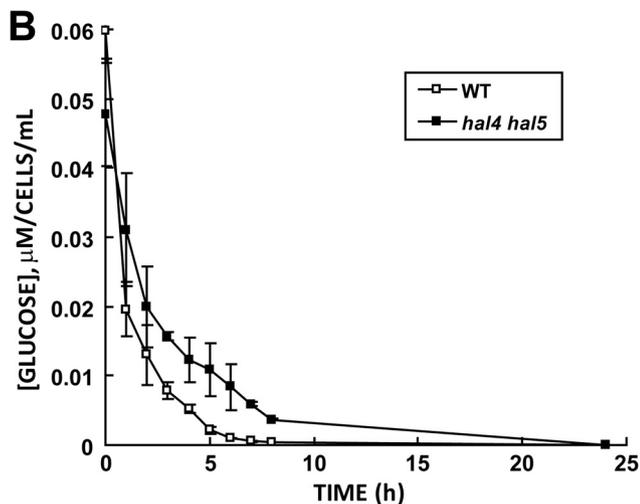


FIG. 4. Changes in energy metabolism in the *hal4 hal5* mutant. (A) Induction of genes in the *hal4 hal5* strain encoding proteins involved in the respiratory chain. Genes induced in either the W303-1A or BY4741 background are underlined. (B) The indicated strains were grown to mid-log phase in YPD pH 4.5 medium and adjusted to an OD₆₆₀ of 0.2 in fresh medium (time zero). Aliquots were taken at the indicated times, and the amount of glucose in the media was determined. Error bars represent the standard deviation of three determinations. Identical results were observed for two independent experiments. (C) The indicated strains (WT, W303-1A) were grown to exponential phase in YPD pH 4.5 medium. Cells were harvested, and succinate dehydrogenase activity (left panel) and ethanol production (right panel) were determined as described in Materials and Methods. Graphs show the median value and the standard deviation from three independent experiments.

1A) and are in agreement with those recently reported for the *trk1 trk2* strain (22).

These observations suggest that the lower intracellular potassium concentration of the *hal4 hal5* mutant is not the only cause of the cytosolic acidification of this mutant. In order to add experimental support to this tentative conclusion, we analyzed the cytosolic pH of the *hal4 hal5* mutant and the wild-

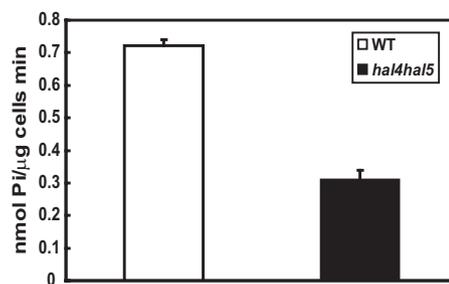


FIG. 5. Pma1 activity in the *hal4 hal5* mutant. W303-1A (WT) cells of the indicated strains were grown in YPD medium to exponential phase and were harvested by centrifugation, washed with water, and preincubated with glucose for 5 min to allow Pma1 activation prior to cell lysis. Pma1 activity was determined by *in vitro* ATP consumption of membrane extracts as described in Materials and Methods. The graph shows the median and the standard deviation from three independent experiments.

type strains transformed with a centromeric plasmid carrying either the wild-type version of *TRK1* or the truncated version lacking the last 35 amino acids of the potassium transporter (*TRK1Δ35*). We previously reported that when the *hal4 hal5* mutant expresses the highly stable and active Trk1Δ35, growth in medium without potassium supplementation is improved and the mutant is no longer sensitive to salt stress (24). As expected from the results described above, we did not observe a statistically significant difference in the cytosolic pH in the *hal4 hal5* mutant expressing the truncated version of *TRK1*, *TRK1Δ35*, compared to that of the *hal4 hal5* mutant expressing the vector containing full-length *TRK1*.

In order to experimentally corroborate the relative decrease in the cytosolic pH of the *hal4 hal5* mutant, we measured the activity of the Pma1 H⁺-ATPase. As shown in Fig. 5, we observed a significant decrease in Pma1 activity. This result is consistent with the observed acidification of the *hal4 hal5* cytosol and correlates with the decreased uptake of nutrients, such as amino acids and glucose, which are symported with protons.

DISCUSSION

As mentioned above, despite much effort, no experimental evidence has been obtained to demonstrate that the Hal4 and Hal5 kinases directly regulate the Trk1 potassium transporter. As we recently demonstrated an alteration in the normal trafficking of this and other nutrient permeases in mutants lacking *HAL4* and *HAL5* (24), we hypothesized that these kinases could be regulating some step of vesicle trafficking and/or endocytosis. Therefore, we analyzed several other aspects of the phenotypes of *hal4 hal5* strains in order to determine the extent of the effect of the lack of these kinases. In our previous studies, we compared the behavior of the *hal4 hal5* mutant strain with that of the wild type during a shift from potassium-supplemented minimal medium to nonsupplemented medium, in which the mutant strain cannot grow (24). In the present study, we have chosen to compare the strains under steady-state conditions in rich medium, which does not require potassium supplementation for growth of the *hal4 hal5* mutant. Using this approach, we present evidence for a more general

defect in nitrogen and carbon availability. Interestingly, we also observe alterations in the internal pH of this mutant which are independent of the internal potassium concentration. These data suggest that there is no simple direct correlation between fluxes of potassium and protons, at least under the experimental conditions tested.

Based on the previously reported trafficking defects of the Can1 and Tat2 amino acid permeases and the relative decrease in internal pH observed here, we tested whether the combined effect of the decreased plasma membrane permease presence and the unfavorable proton gradient driving amino acid uptake would lead to defects in other aspects of nutrient availability. We observed marked defects in both leucine and methionine uptake, as well as an increase in the activation of the GCN pathway, as measured using a β -galactosidase reporter construct. However, supplementing the growth media with excess amino acids is only marginally effective in ameliorating the growth defects of this mutant (24; data not shown).

The phenotypes described above are consistent with a more general defect in nutrient uptake and/or utilization. This conclusion is reinforced by the gene expression analysis, in which we observed the accumulation of mRNAs corresponding to genes implicated in energy metabolism and amino acid biosynthesis. A more detailed analysis of the genes induced in the *hal4 hal5* strain revealed a possible alteration in the metabolic state of this mutant, as reflected by the induction of the nuclear genes encoding virtually all the components of the respiratory chain (Fig. 4A). This altered expression pattern may indicate increased mitochondrial function, presumably to optimize the metabolism of the more limited supply of nutrients. Accordingly, we demonstrate a marked increase in the activity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, although we did not observe any differences in the overall morphology of the mitochondria (data not shown). Interestingly, we also observed decreased glucose consumption and ethanol production in the *hal4 hal5* strain compared to the wild type (Fig. 4B and C and data not shown).

Genes involved in the biosynthesis of methionine were also overrepresented in the list of genes induced in the *hal4 hal5* mutant. We initially hypothesized that this result could be due to oxidative stress, as many genes controlled by the Yap1 transcription factor also accumulate to higher levels in this strain. However, we were unable to detect any significant difference in reactive oxygen species (ROS) levels using 1,2,3-dihydrorhodamine as a probe (data not shown). Therefore, based on the marked defect in methionine uptake, the instability of the Mup1 high-affinity permease, and the fact that essentially all genes involved in the central pathway for methionine biosynthesis are induced, we propose defects in the transport of this amino acid as the most likely explanation for this phenotype.

It is worth pointing out the remarkable reproducibility among the various gene expression analysis data sets. We performed microarray experiments comparing the wild type and the *hal4 hal5* mutants of two different genetic backgrounds (W303-1A and BY4741) and grown in two different media (YPD pH 4.5 and standard YPD [pH 6] media). For example, all but one of the functional categories identified, for both induced and repressed genes, in the BY4741 background were also identified in the W303-1A background, and the same

functional categories were identified regardless of the growth conditions. However, we did observe a larger number of genes which were differentially regulated in the W303-1A strain than that for the BY4741 strain. Interestingly, the majority of these additional genes were related to either carbohydrate metabolism or the general stress response pathway, both principally controlled by the Msn2/Msn4 transcription factors. The identification of genes related to carbohydrate metabolism is in agreement with a general defect in nutrient uptake, which in this case would also involve glucose. As mentioned above, we previously observed a defect in the stability of the Hxt1 glucose permease, which would be consistent with this hypothesis and the observed decrease in glucose consumption. In terms of the general stress response genes, this effect is likely to be explained by the fact that, under all stress conditions we have tested, the W303-1A strains are much more sensitive. Therefore, we postulate that the same environmental conditions provoke a more robust stress response in the more sensitive W303-1A strain.

Here, we have further investigated the functional categories that correspond to the induced genes: energy metabolism and methionine biosynthesis. We provide experimental evidence which both supports the appearance of these categories and provides a possible explanation in terms of the physiology of the *hal4 hal5* mutant, as discussed above. In addition, we also identify two functional categories of repressed genes which were overrepresented in all the transcriptomic analyses of the *hal4 hal5* mutant: amino acid metabolism and adenine biosynthesis. The first functional category contains genes several genes involved in amino acid catabolism (*CHAI1*, *ASP1*, *ARO9*, *ARO10*, *BAT1*, *GCV2*, *GCV3*) and amino acid excretion (*AQR1*). Therefore, if the *hal4 hal5* mutant is defective in amino acid uptake, it makes sense that genes involved in excretion and/or catabolism of these nutrients would be down-regulated.

However, the interpretation of the appearance of genes involved in the biosynthesis of adenine is not so straightforward. It is known that the adenine biosynthesis route is controlled by feedback inhibition on the enzymatic level and by derepression on the transcriptional level (reference 26 and the references therein). The product of the *ADE4* gene, which catalyzes the first step of this pathway, is negatively regulated by ATP and ADP. Therefore, it is unlikely that the nutrient-deprived *hal4 hal5* strain accumulates excess ATP to inhibit this pathway. In terms of the derepression, two transcription factors have been implicated: Pho2 and Bas1. Neither of these genes have an altered expression pattern in the *hal4 hal5* mutant. The most likely explanation resides in the activation of Pho2 and Bas1 by the pathway intermediates SAICAR (5-amino-4-imidazole-*N*-succinocarboxamide ribonucleoside) and AICAR (5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleoside). Although the molecular mechanism of this regulation has not yet been elucidated, it is clear that the relative concentration of these two compounds affects the ability of these two transcription factors to derepress the pathway. Therefore, it is conceivable that differences in the relative concentrations of these intermediates in the *hal4 hal5* mutant explain the lack of derepression observed.

Further analysis of the transcriptome of the *hal4 hal5* mutant also reveals a significant enrichment in genes known to be transcriptionally regulated by a subset of transcription

factors. For example, two factors that are activated by the Hog1 pathway are overrepresented in our analysis (Hot1 and Sko1, with P values of 1.5×10^{-12} and 2.5×10^{-10} , respectively). This result is not surprising, since the decrease in internal potassium concentrations observed in this strain would be expected to lead to a decrease in turgor and thus activation of the Hog1 pathway through its upstream sensors. Accordingly, the *hal4 hal5* mutant presents a decreased cell size and a relative increase in the amount of phosphorylated Hog1 present under standard growth conditions (data not shown).

It is known that the proton gradient generated by the proton ATPase, Pma1, is the driving force for nutrient uptake in yeast (reviewed in reference 4). We show here that the *hal4 hal5* mutant presents phenotypes consistent with a general defect in nutrient uptake and a lower internal pH. These data may suggest a role for these kinases as positive regulators of the Pma1 proton ATPase. Preliminary experiments suggest that the *in vivo* phosphorylation of Pma1 is decreased in the *hal4 hal5* mutant, whereas the amount of Pma1 found in plasma membrane-enriched fractions is not significantly altered (L. Yenush, unpublished observations). The related Ptk2 kinase has been proposed to regulate Pma1 by directly phosphorylating it on serine 899 (9). However, it is unlikely that Hal4 and Hal5 act through this mechanism, as the phenotypes of the *ptk2* mutant and the *hal4 hal5* mutant are considerably different: the *ptk2* mutant is tolerant to toxic cation concentrations, whereas the *hal4 hal5* mutant is sensitive compared to the wild-type strain, and the *ptk2* mutant does not require potassium supplementation for maximal growth on minimal medium. Other reports demonstrate multiple phosphorylation sites for Pma1; therefore, it is likely that multiple kinases regulate this complex ATPase. However, as the function of Trk1 is dependent on the proton gradient generated by Pma1, this is an attractive hypothesis to explain current data regarding Hal4 and Hal5 functions. Experiments are under way to further investigate this possibility.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2005-06388-C04-01/BMC from the Spanish Ministry of Education and Science (Madrid), BFU2008-04188-C03-02 and BFU2008-04188-C03-01 from the Ministry of Science and Innovation (Madrid), and Prometeo/2010/038 (Generalitat Valenciana). J. Pérez-Valle was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Science and Technology.

We thank Scott Emr for providing the *MUP1-GFP* plasmid.

REFERENCES

- Alberola, T. M., J. García-Martínez, O. Antúnez, L. Viladevall, A. Barcelo, J. Ariño, and J. E. Pérez-Ortín. 2004. A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int. Microbiol.* **7**:199–206.
- Ariño, J., J. Ramos, and H. Sychrova. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**:95–120.
- Ashcroft, F. M. 2006. From molecule to malady. *Nature* **440**:440–447.
- Barnett, J. A. 2008. A history of research on yeasts. 13. Active transport and the uptake of various metabolites. *Yeast* **25**:689–731.
- Boyle, E. I., S. Weng, J. Gollub, H. Jin, D. Botstein, J. M. Cherry, and G. Sherlock. 2004. GO::TermFinder—open source software for accessing gene ontology information and finding significantly enriched gene ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **20**:3710–3715.
- Brett, C. L., D. N. Tukaye, S. Mukherjee, and R. Rao. 2005. The yeast endosomal Na⁺K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16**:1396–1405.
- De Craene, J. O., O. Soetens, and B. Andre. 2001. The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J. Biol. Chem.* **276**:43939–43948.
- Edgar, R., M. Domrachev, and A. E. Lash. 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **30**:207–210.
- Eraso, P., M. J. Mazon, and F. Portillo. 2006. Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates *in vitro* the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:164–170.
- Ferrando, A., S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano. 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5470–5481.
- Gaber, R. F., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**:2848–2859.
- Gaxiola, R., I. F. de Larrinoa, J. M. Villalba, and R. Serrano. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**:3157–3164.
- Gietz, R. D., and A. Sugino. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527–534.
- Goossens, A., N. de la Fuente, J. Forment, R. Serrano, and F. Portillo. 2000. Regulation of yeast H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7654–7661.
- Grenson, M., and E. Dubois. 1982. Pleiotropic deficiency in nitrogen-uptake systems and derepression of nitrogen-catabolic enzymes in npr-1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **121**:643–647.
- Hinnebusch, A. G. 1985. A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**:2349–2360.
- Hinnebusch, A. G. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:407–450.
- Miesenbock, G., D. A. De Angelis, and J. E. Rothman. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**:192–195.
- Mulet, J. M., M. P. Leube, S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano. 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell Biol.* **19**:3328–3337.
- Murguía, J. R., J. M. Belles, and R. Serrano. 1995. A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* **267**:232–234.
- Nakai, T., T. Yasuhara, Y. Fujiki, and A. Ohashi. 1995. Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **15**:4441–4452.
- Navarrete, C., S. Petrezselyova, L. Barreto, J. L. Martínez, J. Zahradka, J. Ariño, H. Sychrova, and J. Ramos. 2010. Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res.* **10**:508–517.
- Omura, F., and Y. Kodama. 2004. The N-terminal domain of yeast Bap2 permease is phosphorylated dependently on the Npr1 kinase in response to starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**:227–234.
- Pérez-Valle, J., H. Jenkins, S. Merchan, V. Montiel, J. Ramos, S. Sharma, R. Serrano, and L. Yenush. 2007. Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell. Biol.* **27**:5725–5736.
- Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**:1–30.
- Rolfes, R. J. 2006. Regulation of purine nucleotide biosynthesis: in yeast and beyond. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:786–790.
- Schmidt, A., T. Beck, A. Koller, J. Kunz, and M. N. Hall. 1998. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* **17**:6924–6931.
- Serrano, R. 1983. *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**:11–14.
- Teis, D., S. Saksena, and S. D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* **15**:578–589.
- Teixeira, M. C., P. Monteiro, P. Jain, S. Tenreiro, A. R. Fernandes, N. P. Mira, M. Alenquer, A. T. Freitas, A. L. Oliveira, and L. Sa-Correia. 2006. The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **34**:D446–D451.
- Thomas, B. J., and R. Rothstein. 1989. The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene. *Genetics* **123**:725–738.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, and G. Chu. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:5116–5121.

33. **Vallejo, C. G., and R. Serrano.** 1989. Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* **5**:307–319.
34. **Wolfe, D. M., and D. A. Pearce.** 2006. Channeling studies in yeast: yeast as a model for channelopathies? *Neuromolecular Med.* **8**:279–306.
35. **Yang, R., S. A. Wek, and R. C. Wek.** 2000. Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2706–2717.
36. **Yenush, L., S. Merchan, J. Holmes, and R. Serrano.** 2005. pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **25**:8683–8692.
37. **Yenush, L., J. M. Mulet, J. Ariño, and R. Serrano.** 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**: 920–929.