



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología

**Estudio de los mecanismos de la regulación
de la homeostasis iónica: Análisis fisiológico
y transcriptómico del mutante *hal4hal5* de
*Saccharomyces cerevisiae***

Presentada por:

Jorge Pérez Valle

Dirigida por:

Lynne Yenush

Ramón Serrano

Valencia, 2009

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar al profesor Ramón Serrano que me diera la oportunidad de trabajar en su laboratorio, primero tutorándome durante mi Trabajo Final de Carrera, y más adelante ofreciéndome la posibilidad de realizar una Tesis Doctoral. Hago extensivo este agradecimiento también a Mariche, que con sus continuas atenciones ha conseguido un ambiente inmejorable en el laboratorio.

También quiero agradecer al resto de compañeros del antiguo Laboratorio 3 (Lola, JM, Bea, Edu, Silvia, Santi, Regina, Gaetano, Rosa, Ana Cristina... y todos los que durante todo este tiempo han pasado por el) la buena acogida que me dieron desde el principio, y toda la ayuda que me han prestado a lo largo de estos años de Tesis.

No puedo olvidarme en estos agradecimientos de mis primeros compañeros del laboratorio de Genómica. Quiero dar las gracias a Cinta, mi primera “jefa”, que me llevó de la mano durante mis primeros pasos en el mundo científico. También quiero agradecer a Javier y a Pepe, todo lo que me han ayudado, especialmente en mi batalla con el “análisis global de la expresión génica”. Un agradecimiento especial es para M^a Ángeles, por su constante ayuda en el laboratorio, por sus sabios consejos, y por cuidarme tan bien como lo ha hecho. También quiero dar las gracias a Julia, a la que deseo mucha suerte en el camino que le queda por delante.

Por supuesto, otro agradecimiento especial es para la directora de todo este lío, Lynne, por “ponerme las pilas” cuando me ha hecho falta, y darle a esta tesis el empujón definitivo. Ha sido para mí todo un ejemplo de trabajo, constancia y amor por la ciencia.

También quiero agradecer su ayuda a mis compañeros del laboratorio 2.08. A Markus y Payo, que me han ayudado siempre en todo lo que he necesitado. A Joserra, por su ayuda, y por darme la posibilidad de colaborar con él iniciándome en la farmacogenómica. A sus antiguos becarios, el dúo tinerfeño-argentino Carlos y Mauricio, y al nuevo fichaje Rafa.

A Guillem, que ha sido el mejor compañero de laboratorio que hubiera podido tener, y con el que, literalmente, me volvería a ir a la otra punta del mundo. A Mar, la reina del 2.08, por su inestimable ayuda, tanto personal como científica, y por regalarme siempre una sonrisa cuando la he necesitado. A Fer, que desde hace ya más de una década, es el mejor cómplice que he podido tener en todas mis andaduras, y con el que espero seguir compartiendo tantos buenos y malos momentos. Todos ellos han hecho que cada día costará un poquito menos levantarse para venir al labo.

También quiero dar las gracias a mis antiguas compañeras. A Stephanie, muchas gracias por toda la paciencia que ha tenido conmigo y por todas las cosas que me ha enseñado, y a Jessy, la becaria que compartimos, y que tan activamente participó en los inicios de este trabajo.

Muchas gracias también a todos los que, de una u otra forma, han hecho posible este trabajo. A todo el personal del IBMCP, a Dolores, por su ayuda en los experimentos y las correcciones, y a los Doctores Ariño y Ramos, por su colaboración en algunos de los experimentos de esta Tesis.

Quiero dar las gracias también a mis mejores amigos, con los que he compartido prácticamente todo en la vida: Miguel Ángel, David, Juanjo, Miguel, Pablo, José Miguel, Raúl y Sergio. Cada uno de ellos sabe que para mí es como un hermano. Y a Rosa, que en estos últimos meses ha devuelto la alegría a mi vida, y que junto con Inma, me ha alegrado las largas mañanas de escritura vía *Messenger*.

He dejado para el final el agradecimiento a las personas que probablemente más lo merecen. A mis padres Jesús y Angelines, que siempre me han apoyado en todo lo que he hecho, y que me han enseñado las cosas que realmente importan en la vida. Ellos han hecho de mí la persona que soy hoy en día. Y a mi hermana Sonia, que también ha estado siempre a mi lado, ayudándome desde que era pequeño, y que ha sido para mí un ejemplo a seguir.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Homeostasis iónica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2. El transporte de potasio en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
3. Las proteínas quinasas Hal4 y Hal5.....	9
4. Regulación de los transportadores de la membrana plasmática	11
5. Trabajos previos con Hal4 y Hal5	17
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Cultivo y manipulación celular	25
1.1. Bacterias	25
1.2. Levaduras	25
1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos).....	27
1.2.2. Ensayos de crecimiento en medio líquido	28
2. Técnicas de transferencia génica.....	29
2.1. Transformaciones en bacteria	29
2.2. Transformaciones en levadura	29
3. Técnicas de manipulación genética	30
3.1. Generación de plásmidos	30
3.2. Generación de la cepa mutante <i>hal4hal5npi1</i>	31
4. Obtención de extractos proteicos.....	32
4.1. Obtención de extractos proteicos de la célula completa.....	32
4.2. Obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble.....	32

5. Electroforesis y técnicas de detección de proteínas	33
5.1. Electroforesis de proteínas	33
5.2. Transferencia a membrana.....	33
5.3. Tinción de membranas con Ponceau S.....	33
5.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas.....	34
6. Genómica funcional.....	35
6.1. Extracción de RNA de levaduras.....	35
6.2. Marcaje de los RNAs de levadura	35
6.3. Hibridación de las micromatrices.....	36
6.4. Análisis de las micromatrices.....	36
6.5. Análisis <i>Northern</i>	37
7. Otras medidas fisiológicas	38
7.1. Medidas <i>in vivo</i> del pH interno de las células de levadura	38
7.2. Medidas del número de células y del tamaño celular	38
7.3. Ensayos de actividad β -galactosidasa.....	39
7.4. Medidas de potasio por HPLC.....	39
7.5. Medidas de toma de rubidio.....	40
7.6. Medidas de toma de leucina y metionina en células de levadura.....	40
7.7. Ensayos de actividad succinato-deshidrogenasa (SDH).....	41
7.8. Microscopia confocal	41
7.9. Tinción de vacuolas	41
IV. RESULTADOS	43
Parte I: Análisis fisiológico y transcriptómico del mutante <i>hal4hal5</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	45
1. Ensayos de crecimiento en medio líquido del mutante <i>hal4hal5</i>	47
2. Medidas de la concentración intracelular de potasio en el mutante <i>hal4hal5</i>	50

3. Experimentos con una versión truncada de Trk1	51
4. Medidas <i>in vivo</i> del pH intracelular en el mutante <i>hal4hal5</i>	53
5. Medidas de la toma de leucina en el mutante <i>hal4hal5</i>	56
6. Medidas de la actividad de la ruta GCN en el mutante <i>hal4hal5</i>	60
7. Análisis transcriptómico del mutante <i>hal4hal5</i>	62
8. Metabolismo aeróbico en el mutante <i>hal4hal5</i>	69
9. Toma de metionina en el mutante <i>hal4hal5</i>	72

Parte II: Estudio de la interacción entre las quinasas Hal4 y Hal5, y el sistema de transporte de potasio de alta afinidad Trk1-Trk2 de *Saccharomyces cerevisiae*

75

1. Localización subcelular de la proteína Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i>	77
2. Efecto de la presión osmótica sobre la estabilidad y/o localización del transportador Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i>	81
3. Efecto de la sobreexpresión de <i>HAL5</i> sobre la estabilidad de Trk1 en la membrana plasmática	84
4. Efecto de la doble mutación <i>hal4hal5</i> sobre otros transportadores de la membrana plasmática	86
5. Análisis de la estabilidad de la versión truncada de Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i>	93
6. Análisis de la estabilidad de otros transportadores de la membrana plasmática en células que expresan la versión truncada de Trk1	94

V. DISCUSIÓN

99

VI. CONCLUSIONES

115

VII. BIBLIOGRAFÍA

119

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
----------------------------------	-----

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	136
--------------------------------	-----

ANEXO I.....137

Genes seleccionados como inducidos o reprimidos en los distintos experimentos
de análisis global de la expresión génica 137

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Representación esquemática de los transportadores TRK-HKT	5
Figura 1.2. Modelo de regulación del sistema de transporte de potasio Trk1	9
Figura 1.3. Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo	26
Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados en este trabajo	34

RESULTADOS

Figura 4.1. Ensayos de crecimiento en medio líquido	49
Tabla 4.2. Concentración intracelular de potasio en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre	50
Figura 4.3. Análisis de los fenotipos del mutante <i>hal4hal5</i> expresando una versión truncada de Trk1.....	52
Figura 4.4. Medidas de pH intracelular en el mutante <i>hal4hal5</i>	54
Figura 4.5. Medidas de pH intracelular en el mutante <i>hal4hal5</i> expresando la versión silvestre <i>TRK1</i> y la versión truncada <i>TRK1Δ35</i>	56
Figura 4.6. Toma de leucina en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre en medio rico.....	57
Figura 4.7. Toma de leucina en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre en medio mínimo.....	59
Figura 4.8. Actividad de la ruta GCN en células crecidas en medio rico YPD	61
Figura 4.9. Actividad de la ruta GCN en células crecidas en medio rico YPD pH 4.5 y medio rico YPD.....	62

Figura 4.10. Comparación entre el número de genes inducidos y reprimidos en el mutante <i>hal4hal5</i> en los fondos genéticos BY4741 y W303	64
Figura 4.11. Categorías funcionales sobre-representadas entre los genes seleccionados como inducidos en el mutante <i>hal4hal5</i>	67
Figura 4.12. Categorías funcionales sobre-representadas entre los genes seleccionados como reprimidos en el mutante <i>hal4hal5</i>	68
Figura 4.13. Análisis de la morfología de la mitocondria en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre.....	70
Figura 4.14. Medidas de la actividad SDH en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre	71
Figura 4.15. Medidas de los niveles de expresión de los genes <i>SDH2</i> y <i>COX6</i> en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre	72
Figura 4.16. Toma de metionina en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre.....	73
Figura 4.17. Trk1 es menos estable en el mutante <i>hal4hal5</i> después del ayuno de potasio.....	79
Figura 4.18. Toma de rubidio en el mutante <i>hal4hal5</i> y en la cepa silvestre	80
Figura 4.19. La acumulación en la vacuola de Trk1 no es debida a los cambios en la presión osmótica producidos durante el ayuno de potasio	83
Figura 4.20. La sobre-expresión de <i>HAL5</i> conduce a la acumulación de Trk1 en la membrana plasmática	85
Figura 4.21. Localización subcelular de los transportadores / permeasas de nutrientes en las cepas silvestres, <i>hal4hal5</i> y <i>trk1trk2</i>	88
Figura 4.22. Análisis <i>Western</i> de la proteína Fur4 en la fracción insoluble.....	89
Figura 4.23. Localización subcelular de la permeasa Gap1 y de la proteína estructural de la membrana plasmática Sur7.....	91
Figura 4.24. Una reducción en la expresión de Rsp5 conduce a un descenso de la cantidad de Trk1 en el mutante <i>hal4hal5</i> y no corrige sus defectos de crecimiento.....	93
Figura 4.25. Análisis <i>Western</i> de las versiones silvestre y truncada de la proteína Trk1	94

Figura 4.26. Localización subcelular de los transportadores / permeasas de nutrientes en el mutante *hal4hal5* expresando las versiones silvestre y truncada de *TRK1*96

Figura 4.27. Requisitos para el crecimiento del mutante *hal4hal5*.....97

ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosin trifosfato
BSA	albumina de suero bovino
dCTP	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
DMR	fracciones de membrana resistentes a detergente.
DTE	1,4-dithioeritritol
dUTP	uridina 5'-difosfato
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (quimioluminiscencia mejorada)
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminetetraacético)
FDR	<i>False Discovery Rate</i> (probabilidad de error en la selección de un gen)
GCN	<i>General Control of Nutrients</i> (control general de nutrientes)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
GO	<i>Gene Ontology</i>
HA	hemagglutinina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> (ácido 4-(2-hidroxyethyl)-1-piperaziniletanosulfónico)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
LB	Medio Luria-Bertani
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógeno)
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i> (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico)
MPM	membrana-poro-membrana
OLB	<i>Overgo Labelling Buffer</i> (tampón de marcaje)
ONPG	<i>Ortho-Nitrophenyl-b-D-GalactoPyranoside</i> (ortho-nitrofenil-b-D-galactopiranosida)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (trama de lectura abierta)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	polietilenglicol
PonS	PonceauS
S	serina
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i> (Análisis de significación en los microarrays)
SD	medio mínimo sintético
SDH	succinato deshidrogenasa
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i> (base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i>)
SSC	<i>Sodium Saline Citrate</i> (citrato salino sódico)

T	treonina
TBS	<i>Tris-Buffered-Salin</i>
YPD	Medio rico <i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. Homeostasis iónica en *Saccharomyces cerevisiae*.

La homeostasis de las concentraciones intracelulares de iones es una propiedad fundamental de las células. Los transportadores de iones y sus sistemas de regulación tienen funciones fisiológicas de gran importancia. Principalmente estos sistemas se ocupan de mantener las concentraciones de iones dentro de un rango óptimo para los sistemas celulares. En general, y con excepción de las algunas bacterias halofíticas, este rango consiste en relativamente altas concentraciones de potasio (10^{-1} M) y magnesio (10^{-3} M), y concentraciones relativamente bajas de sodio (10^{-2} M), protones (10^{-7} M) y calcio (10^{-7} M) (Serrano et al., 1999). La base físico-química de esta selección no está del todo clara, pero tenemos algunas pistas que nos pueden ayudar a entenderla. Un pH neutro puede ser necesario para mantener la estabilidad de las proteínas, y un cociente magnesio/calcio alto favorece la solubilidad de los compuestos de fosfato. La preferencia de potasio en lugar de sodio como principal catión intracelular puede explicarse por el bajo nivel de interacción del potasio con los sitios de unión a magnesio de algunas enzimas claves, como las fosfatas de la familia de Hal2, cuya función sí puede verse afectada por los iones sodio o litio (Albert et al., 2000). Además, las concentraciones de potasio son el principal determinante de algunos parámetros fisiológicos tan importantes como el volumen celular, la turgencia o la fuerza iónica del citoplasma en hongos y plantas, que determina la óptima hidratación de macromoléculas y membranas (Serrano, 1996).

La mayor parte de las células de mamíferos se encuentran inmersas en un fluido extracelular cuya presión osmótica, pH y concentración de iones es más o menos constante debido a la acción de los riñones. En estas células la principal bomba es la ATPasa de sodio y potasio, que junto con los canales de sodio y potasio, los antiportadores Na^+/H^+ y los simportadores (Na^+ , K^+ , 2Cl^-) determina el volumen celular y las concentraciones intracelulares de iones. En estas condiciones, la toma celular de azúcares y aminoácidos está mediada por cotransporte con sodio (Stein, 1990). En comparación con el ambiente predecible en el que viven la mayor parte de células de mamíferos, las células de plantas, algas u hongos deben tolerar un amplio rango de presiones osmóticas, pH y concentraciones de iones en sus entornos. La pared celular de estos organismos es parcialmente responsable

de su tolerancia a cambios osmóticos. Sin embargo, estudios fisiológicos llevados a cabo en microorganismos fúngicos han demostrado que su capacidad para proliferar en un amplio rango de concentraciones de iones es consecuencia de una estrategia de transporte en la membrana plasmática diferente a la de las células de mamíferos (Serrano, 1991). Las membranas plasmáticas de plantas y hongos contienen una ATPasa exportadora de protones altamente activa. El transporte de nutrientes e iones está acoplado en su mayor parte al gradiente de protones resultante de la acción de esta ATPasa, lo que permite que las concentraciones intracelulares de los iones sodio y potasio puedan ser reguladas de forma independiente (Serrano, 1991).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la ATPasa de protones de la membrana plasmática está codificada por el gen esencial *PMA1*. 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).

El mantenimiento de las concentraciones internas de iones frente a un amplio rango de condiciones extracelulares está mediado por complejas rutas homeostáticas. Las señales que disparan las respuestas de adaptación pueden ser cambios en la turgencia detectados en la membrana plasmática, o cambios en las concentraciones intracelulares de cationes como el potasio, el sodio o el calcio, que son detectados por proteínas citosólicas (Serrano, 1996). Se han caracterizado muchos de los transportadores de cationes a nivel molecular, pero se sabe menos acerca de las rutas de transducción que regulan sus actividades y determinan la homeostasis de iones. Un mejor entendimiento de estos sistemas y de su regulación puede tener un considerable valor práctico. En medicina, un mejor entendimiento de los transportadores de iones y su regulación, ha contribuido a la demostración de que los defectos en la homeostasis iónica contribuyen al riesgo de padecer alta presión arterial (Lifton, 1996), y también se ha visto que puede afectar al sistema nervioso, a los músculos, y a los riñones (Pollard y Earnshaw, 2002). Por otra parte, en agricultura, el mejor entendimiento de las proteínas implicadas en la homeostasis de iones podría facilitar el desarrollo de plantas con mayor tolerancia a sequía o salinidad por medio de técnicas de ingeniería genética (Serrano, 1996).

2. El transporte de potasio en *Saccharomyces cerevisiae*.

La toma de potasio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está mediada principalmente por el sistema TRK, codificado por dos genes parcialmente redundantes, *TRK1* y *TRK2* (Gaber et al., 1988) (Ko y Gaber, 1991) (Ramos et al., 1994). El sistema TRK es uno de los principales determinantes del potencial eléctrico de la membrana plasmática, y por tanto, de la toma de cationes (Madrid et al., 1998), ya que su acción contribuye a relajar el gradiente eléctrico inducido por el funcionamiento de Pma1.

El gen *TRK1* codifica el transportador más activo, una proteína grande de 1.235 aminoácidos, con 8 dominios trans-membrana y 4 estructuras MPM (membrana-poro-membrana) (Durell y Guy, 1999) (Gaber et al., 1988) (Figura 1.1). Al igual que la ATPasa de protones Pma1, Trk1 es una proteína integral de la membrana plasmática. 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 y Andre, 2006). Estas fracciones de membrana están enriquecidas en esfingolípidos que contienen inositol y en ergosterol, el principal esteroide estructural de los hongos (Bagnat et al., 2000). Se ha descrito que estos esfingolípidos participan en el tráfico de proteínas a la membrana plasmática (Bagnat et al., 2001; Gaigg et al., 2005; Umebayashi y Nakano, 2003).

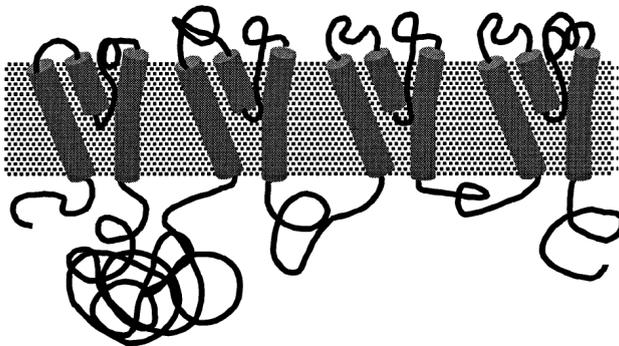


FIG. 1.1. Representación esquemática de los transportadores TRK-HKT basada en la estructura MPM de los dominios trans-membrana. La parte superior se corresponde con la cara externa de la membrana plasmática. Adaptado de Durell *et al.* 1999.

El gen *TRK1* de *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer gen codificante de un transportador de potasio clonado en células eucariotas (Gaber et al., 1988).

El gen *TRK2* fue identificado y clonado en *S. cerevisiae* posteriormente (Ko et al., 1990) (Ko y Gaber, 1991). Las proteínas Trk1 y Trk2 son idénticas en un 55% de su secuencia, y esta homología es aún mayor en los segmentos hidrofóbicos, donde puede alcanzar el 90%. Sin embargo, el papel del gen *TRK2* solo parece ser importante en el mutante *trk1*, a pesar de que ambos sistemas tienen afinidades similares por el ión potasio ($K_m = 20 - 50 \mu\text{M}$) y por el ión rubidio ($K_m = 0,1 - 0,3 \text{ mM}$) (Ramos et al., 1994).

Utilizando una sonda correspondiente a la región conservada de los genes *TRK1* y *TRK2* de *S. cerevisiae* se clonó un gen homólogo en *Schizosaccharomyces pombe* (Soldatenkov et al., 1995). La expresión funcional de este gen en el mutante *trk1* de *S. cerevisiae* demostró que codificaba un transportador de potasio (Lichtenberg-Frate et al., 1996). En el proyecto de secuenciación del genoma de *S. pombe* se identificó un segundo gen de la misma familia, correspondiente a *TRK2*. Los genes *TRK1* y *TRK2* de *S. pombe* codifican proteínas de 841 y 881 aminoácidos, más parecidos al gen *TRK2* que al gen *TRK1* de *S. cerevisiae*.

También se han encontrado transportadores del tipo TRK en *Neurospora crassa* (Haro et al., 1999), *Schwanniomyces occidentalis* (Banuelos et al., 2000) y *Debaryomyces hansenii* (Prista et al., 2007). En estas especies, además de los sistemas de transporte del tipo TRK, también están presentes otro tipo de transportadores de potasio, los HAK (*High-Affinity K⁺-transporter*), que no existen en *S. cerevisiae*.

Transformando el mutante *trk1trk2* de *S. cerevisiae* con una biblioteca de cDNA de trigo construida en un vector de expresión en levadura, se aisló un clon capaz de suprimir los defectos de toma de potasio del mutante (Schachtman y Schroeder, 1994). El cDNA clonado, *HKT1*, codificaba una proteína de 534 aminoácidos y 58,9 kDa con altos niveles de homología de secuencia con los transportadores TRK. Diversos estudios de expresión génica mostraron que los niveles de RNA mensajero del gen *HKT1* en raíces de cebada

aumentaban al quitar el potasio del medio de crecimiento, mientras que se hacían menores al volver a suplementar el medio con potasio (Wang et al., 1998). Previamente, y utilizando estos mismos procedimientos, se habían descubierto los primeros transportadores de potasio en plantas, los canales de potasio *AKT1* y *KAT1* (Sentenac et al., 1992; Anderson et al., 1992).

En los proyectos genoma, tanto de arroz como de *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado transportadores del tipo HKT/TRK. En arroz se ha visto que hay 8 transportadores HKT/TRK, mientras que en *Arabidopsis* sólo se ha encontrado uno, y se ha visto también que los distintos transportadores de esta familia pueden variar su afinidad por sodio o potasio (Garcia-deblas et al., 2003).

También se ha visto que los transportadores TRK de levadura están relacionados con un gran número de transportadores de bacteria, los transportadores llamados KtrB (anteriormente NtpJ) y los transportadores TrkH (Nakamura et al., 1998).

En *S. cerevisiae*, se han identificado otros transportadores de la membrana plasmática que contribuyen a la regulación de las concentraciones intracelulares de potasio (Maresova et al., 2006). En condiciones específicas, por ejemplo estrés por KCl, el potasio puede ser sacado de las células de forma activa a través de las ATPasas Ena/Pmr2, o por el antiportador Nha1. Estos sistemas de extrusión de potasio también son capaces de transportar otros cationes como sodio o litio (Haro et al., 1991), (Banuelos et al., 1998). Las ATPasas Ena/Pmr2 son necesarias para el crecimiento celular en altas concentraciones de NaCl o KCl (Banuelos et al., 1998). Nha1 es un sistema típico de transporte secundario activo, que utiliza el gradiente de protones generado por la ATPasa Pma1 como fuente de energía para la extrusión de sodio o potasio.

Existe otro transportador en la membrana plasmática que es específico para potasio, el canal Tok1. Las propiedades biofísicas de este canal de potasio han sido descritas con detalle (Bertl et al., 1993), pero su papel fisiológico aún no se ha caracterizado completamente. Tok1 es un canal de potasio dependiente de voltaje con dos dominios de

poro en tandem (Ketchum et al., 1995). Normalmente tiene una fuerte actividad de extrusión, pero se ha descrito que bajo ciertas condiciones también es capaz de mediar la toma de potasio (Bertl et al., 1993) (Fairman et al., 1999). Tok1 se activa por despolarización de la membrana plasmática (Bertl et al., 1993), y probablemente libera el potasio acumulado en las células para regenerar el potencial de membrana (Bertl et al., 1998). Varios estudios sugieren que Tok1 es la diana molecular de la toxina K1 (*killer toxin*) (Ahmed et al., 1999; Sesti et al., 2001), pero esta teoría ha sido cuestionada posteriormente (Breinig et al., 2002). También se ha demostrado que Tok1 puede ser fosforilado por la quinasa Hog1, lo que sugiere que este canal está participando en la respuesta a estrés osmótico, probablemente mediando la salida de potasio durante la fase inicial del estrés (Proft y Struhl, 2004).

La regulación de la actividad del sistema TRK afecta 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 quinasas 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.

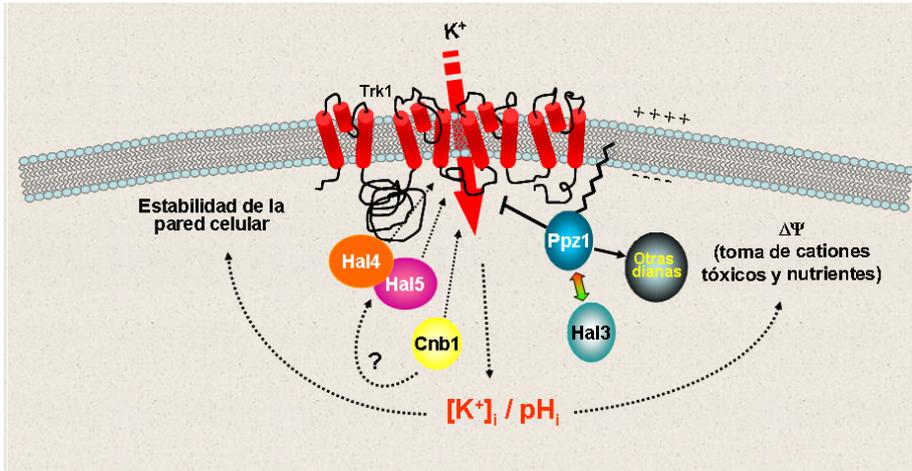


FIG. 1.2. Modelo de regulación del sistema de transporte de potasio Trk1. La regulación de la actividad del sistema TRK afecta a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células, al potencial eléctrico de membrana, y al pH intracelular. En el esquema se muestran algunas de las proteínas que participan en la regulación del transporte de potasio mediado por el sistema Trk1-Trk2 en *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Las proteínas quinasas Hal4 y Hal5.

Las proteínas Hal4/Sat4 y Hal5 son dos serina/treonina quinasas parcialmente redundantes que fueron identificadas por su capacidad de conferir tolerancia a salinidad (*halotolerance*) por sobre-expresión en *Saccharomyces cerevisiae* (Mulet et al., 1999). Estudios genéticos han postulado que estas dos quinasas 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 *hal4hal5* requiere la adición de potasio para crecer en medio mínimo. Además, la sobre-expresión de los genes *HAL4* y *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).

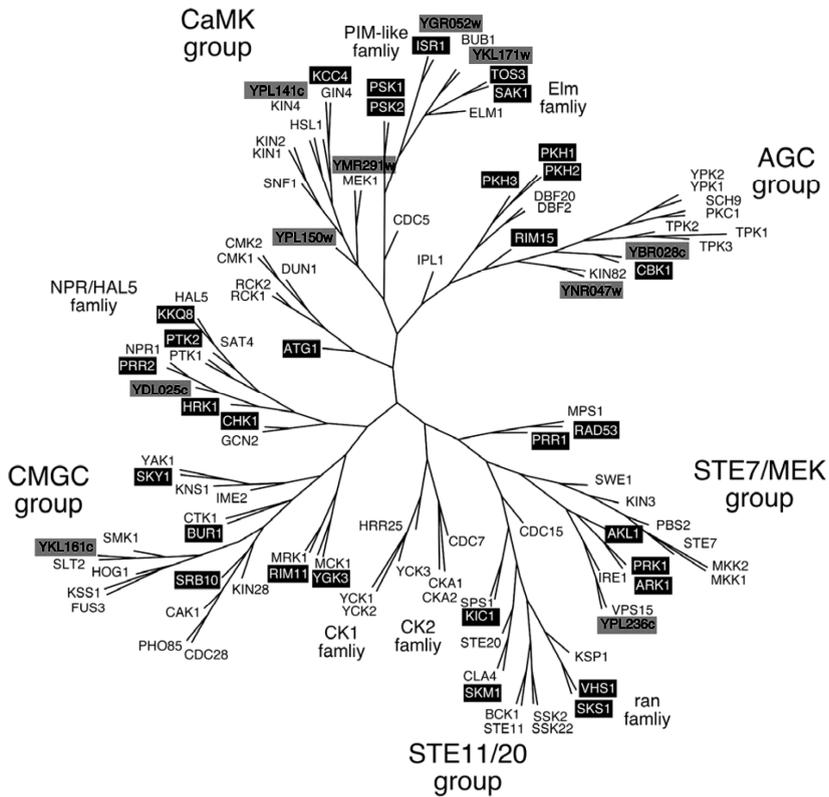


FIG. 1.3. Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de *Saccharomyces cerevisiae*, adaptado de Rubenstein y Schmidt, 2007. Los principales grupos y familias de proteínas quinasas se muestran con letras más grandes. Las quinasas que se han nombrado o renombrado después de la primera aparición de este dendrograma (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 en negro sobre fondo gris.

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

Dos de las quinasas del grupo, Ptk1 (Stk1) y Ptk2, participan en la regulación del transporte de poliaminas (Kakinuma et al., 1995; Kaouass et al., 1997; Nozaki et al., 1996). También se ha visto que la quinasa Ptk2 participa en la activación por glucosa de la ATPasa

de la membrana plasmática (Goossens et al., 2000). 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). Otra de las quinasas de este grupo, Hrk1, también parece estar implicada en la regulación de Pma1 (Goossens et al., 2000).

La quinasa Npr1 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).

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). La función de la quinasa Prr2 parece estar relacionada con la modulación de la señalización por feromonas (Burchett et al., 2001). Otra de las quinasas de este grupo, Chk1, parece estar implicada en la respuesta celular al daño al DNA (Liu et al., 2000). La función de las otras dos quinasas del grupo, Kkq8 y YDL025C, por el momento es desconocida.

4. Regulación de los transportadores de la membrana plasmática.

Sólo en el cromosoma III de *Saccharomyces cerevisiae*, que supone un 2,5% del genoma completo, se supone que hay codificadas 33 proteínas de la membrana plasmática.

En base a estos datos, se ha estimado que el genoma de la levadura codifica más de 1000 proteínas que desempeñan su función en la membrana plasmática (Goffeau et al., 1993b; Goffeau et al., 1993a). Otros trabajos, teniendo en cuenta que muchos de los genes que codifican estas proteínas de transporte están presentes en varias copias en el genoma, y que no todas estas proteínas se van a expresar a la vez, cifran este número en una cantidad menor. Se ha estimado que en las fracciones de membrana plasmática hay alrededor de 150 polipéptidos distintos (Rank y Robertson, 1983).

Las proteínas dedicadas al transporte son probablemente las proteínas mayoritarias de la membrana plasmática. La proteína más abundante en la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* es la ATPasa de protones Pma1, que constituye más del 50 % del contenido total de proteínas de la membrana en células en fase exponencial de crecimiento (Serrano, 1991). Cada aminoácido es transportado por al menos una proteína (Grenson, 1992), y los distintos azúcares que entran en las células son transportados por al menos 15 proteínas diferentes (Lagunas, 1993). El resto de proteínas de la membrana plasmática están implicadas en la biosíntesis de la pared celular (Fleet, 1991), en la transducción de señales (Oehlen y Cross, 1994), o forman parte del citoesqueleto (Barnes et al., 1990).

Cada uno de estos transportadores de la membrana plasmática debe ser regulado de manera específica para permitir la viabilidad de las células en respuesta a los cambios que se producen en el medio ambiente. Esta regulación puede darse a distintos niveles. Algunos transportadores se regulan a nivel transcripcional, mientras que para otros son más importantes las modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación o la ubiquitinación.

La regulación del transportador de membrana dependiente de ATP, Pdr12, es un claro ejemplo de regulación transcripcional de una proteína transportadora. La expresión del gen *PDR12* está regulada por el pH de forma muy específica. Al someter las células a pH ácido la expresión de este gen aumenta de forma considerable, mientras que un estrés por pH alcalino produce un descenso en los niveles de expresión del gen (Causton et al., 2001).

Otro ejemplo de regulación de transportadores a nivel transcripcional es el de los genes *HXT*, que codifican transportadores de hexosa. Mientras que los niveles de expresión del gen *HXT1* aumentan por altas concentraciones de glucosa, los niveles de expresión de los genes *HXT2* y *HXT4* aumentan cuando baja la concentración de glucosa del medio. Por otra parte, el gen *HXT3* aumenta sus niveles de expresión en respuesta a la glucosa, con independencia de la concentración (Ozcan y Johnston, 1999). La mayor parte de estas proteínas Hxt contienen sitios consenso para la fosforilación por la proteína quinasa A o la caseína quinasa II, lo que sugiere que también pueden verse sometidas a algún tipo de modificación post-traducciona, pero hasta el momento no se han encontrado evidencias de este tipo de modificaciones (Ozcan y Johnston, 1999). Sí se ha descrito la regulación post-traducciona de algunas de las proteínas que participan en la activación transcripcional de los genes *HXT*. Cuando las moléculas de glucosa se unen a los sensores Snf3 y Rgt2, estimulan la degradación de las proteínas Mth1 y Std1, probablemente por medio de la activación de las casein-quinasas Yck1 e Yck2 (Kim et al., 2006), que fosforilan a Mth1 y Std1 haciéndolos susceptibles a ubiquitinación. Una vez ubiquitinadas estas dos proteínas son reconocidas por el proteosoma y degradadas (Moriya y Johnston, 2004; Spielewoy et al., 2004). La función de estas dos proteínas es bloquear la transcripción de los genes *HXT*, para lo cual bloquean el factor de transcripción Rgt1. Una vez degradadas, se libera Rgt1 y va al núcleo, donde promueve la transcripción de los genes *HXT* (Forsberg y Ljungdahl, 2001; Holsbeeks et al., 2004; Johnston y Kim, 2005; Ozcan y Johnston, 1999; Rolland et al., 2002).

Como se ha comentado anteriormente algunos transportadores son regulados de forma post-traducciona. La fosforilación y defosforilación de las proteínas participa en la regulación de muchos procesos celulares como la transducción de señales, la progresión del ciclo celular o la expresión génica (Zolnierowicz y Bollen, 2000). La secuencia de nucleótidos del genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* predice que, de los aproximadamente 6000 genes de este organismo, habrá 117 proteínas quinasas y 32 proteínas fosfatasa (Sakumoto et al., 1999). Actualmente se está tratando de establecer la función de estas proteínas en modelos eucariotas unicelulares, como paso previo para la identificación de sus papeles fisiológicos en eucariotas superiores (Hirasaki et al., 2008).

Una de las estrategias de las células eucariotas es utilizar cascadas de fosforilación de MAPK (*mitogen activated protein kinase*) para la señalización intracelular de un estrés. La adaptación al estrés osmótico requiere la activación de una cascada de fosforilación que termina con la activación de la MAPK Hog1. Esta forma activa de la proteína Hog1 se desplaza hasta el núcleo, donde por fosforilación de al menos tres factores de transcripción distintos (Sko1, Hot1 y Smp1), promueve la regulación de más del 10% del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (O'Rourke y Herskowitz, 2004). Se ha comprobado que la forma activada de la proteína Hog1, además de sus efectos sobre la transcripción, actúa también en la membrana plasmática, donde fosforila directamente algunos transportadores de iones para lograr un reajuste rápido de los flujos de sodio y potasio (Proft y Struhl, 2004). La fosforilación de una proteína de la membrana plasmática por la MAPK Hog1 también puede servir como señal para su degradación. Se ha descrito que en condiciones de estrés causado por ácido acético, la aquagliceroporina de la membrana plasmática Fps1 es fosforilada por Hog1, lo que promueve su degradación, mejorando así la resistencia al ácido acético (Mollapour y Piper, 2007).

Otro proceso clave de regulación de los transportadores de la membrana plasmática es la ubiquitinación. La ubiquitinación es una modificación post-traducciona en la que un polipéptido de 76 aminoácidos, llamado ubiquitina, o una cadena de multi-ubiquitina, se une a las proteínas y las marca para su posterior degradación (Ciechanover, 1998). La ubiquitinación es un paso necesario para la degradación de algunas proteínas de la membrana plasmática como el receptor del factor α , Ste2 (Hicke y Riezman, 1996), y la permeasa de uracilo Fur4 (Galan et al., 1996). La ubiquitinación promueve la regulación negativa de estas proteínas, ya que sirve como señal para su internalización en la vía endocítica que finaliza con la degradación en la vacuola. Esta también parece ser la principal señal para la internalización de las proteínas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajos más recientes han demostrado que, en algunas ocasiones, la ubiquitinación de las proteínas de la membrana plasmática se ve regulada de forma positiva por fenómenos de fosforilación, y que el tipo de ubiquitinación necesario para promover la endocitosis puede variar de unas proteínas a otras (Hicke, 1997).

Otro caso interesante es la regulación de la permeasa general de aminoácidos Gap1. En células creciendo en prolina o urea como única fuente de nitrógeno, la proteína Gap1 es sintetizada y transportada a la membrana plasmática, donde se acumula. Si se añade amonio al medio, una fuente de nitrógeno preferente, la proteína Gap1 es endocitada y dirigida hacia la vacuola para su degradación. Se ha comprobado estos procesos de regulación están dirigidos por fenómenos previos de fosforilación o ubiquitinación. Al añadir amonio como fuente de nitrógeno a células crecidas en un medio cuya fuente de nitrógeno es urea o prolina, se ha visto que la ubiquitinación de la permeasa de aminoácidos Gap1 es esencial para que se produzca su endocitosis, y la posterior degradación vacuolar, (Soetens et al., 2001). Se ha comprobado que la ubiquitin-ligasa Rsp5, y otras dos proteínas que interaccionan con ella, Bul1 y Bul2, son esenciales para este proceso (Soetens et al., 2001). También se ha descrito que la quinasa Npr1 es necesaria para estabilizar Gap1 en la membrana plasmática cuando las células crecen en presencia de urea o prolina como fuente de nitrógeno. Se analizó la influencia de una mutación termosensible *npr1* sobre los niveles de Gap1 en la membrana plasmática, y se comprobó que, durante el crecimiento en un medio con prolina como fuente de nitrógeno, al llevar a las células a la temperatura restrictiva, se producía una regulación negativa de Gap1, igual a la que se produce al cambiar la fuente de nitrógeno por amonio (De Craene et al., 2001). También se comprobó que la quinasa Npr1 participa en el tráfico de la proteína Gap1 recién sintetizada hacia la membrana plasmática. En el mutante *npr1*, la proteína Gap1 una vez es sintetizada se dirige directamente desde el aparato de Golgi a la vacuola sin pasar por la membrana plasmática (De Craene et al., 2001). Se piensa que Npr1 podría estar actuando como regulador de la ubiquitinación de Gap1, protegiendo a la permeasa de la ubiquitinación cuando las células crecen en una fuente de nitrógeno pobre. Sin embargo, hasta ahora no ha sido posible establecer experimentalmente una fosforilación directa de Gap1 por la quinasa Npr1 (De Craene et al., 2001).

La permeasa de triptófano Tat2 se regula de forma inversa a la permeasa de aminoácidos Gap1. Tat2 es ubiquitinada, dirigida a la vacuola y degradada en condiciones de ayuno de nitrógeno o carbono, o cuando se pasa las células a un medio de crecimiento con una fuente pobre de nitrógeno (Beck et al., 1999). Gap1 y Tat2 se regulan de forma inversa,

posiblemente para optimizar la toma de aminoácidos en función de la cantidad y la calidad de los nutrientes del medio de crecimiento. Se ha descrito que, aunque parece que Npr1 regula a la permeasa Gap1 de forma positiva, esta quinasa es un regulador negativo de Tat2, aunque tampoco en este caso se han encontrado evidencias de una fosforilación directa de Tat2 por Npr1 (Schmidt et al., 1998).

Del mismo modo que la actividad de las permeasas de nutrientes está regulada por el entorno, debe producirse también una estricta regulación de los transportadores de iones. El mantenimiento de la homeostasis iónica en respuesta a los cambios que se producen en el medio ambiente es vital para las células. En muchos casos, el delicado balance entre los distintos iones está determinado por la expresión específica de los genes que codifican los canales, las bombas y los transportadores iónicos. Sin embargo, en los últimos años, se ha visto que la modificación post-traducciona de estas proteínas, especialmente la fosforilación, también juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis iónica (Fuglsang et al., 1999; Hayashi et al., 2002; Proft y Struhl, 2004).

Hay algunos ejemplos de regulación dependiente de fosforilación para las actividades de algunos canales y bombas, pero en el caso de transportadores hay mucha menos información (Antz et al., 1999; Esguerra et al., 1994; Wang et al., 1996). Recientemente se ha publicado que un transportador de nitratos de *Arabidopsis* puede cambiar su afinidad mediante la fosforilación de un residuo de treonina (Liu y Tsay, 2003). Este papel de la fosforilación en la regulación de la homeostasis iónica implica la existencia de rutas de transducción de señales, en las que quinasa y fosfatasa actúan sobre sustratos en respuesta a distintos estímulos percibidos por las células. En la mayoría de los casos estas rutas de transducción de señales no se han caracterizado, pero parecen tener una importancia vital en el mantenimiento de la homeostasis iónica, especialmente en respuesta a los cambios producidos en el ambiente exterior.

5. Trabajos previos con Hal4 y Hal5.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, Hal4 y Hal5 son dos proteínas quinastas parcialmente redundantes, y necesarias para la homeostasis iónica. Fueron identificadas por su capacidad para conferir tolerancia a sodio y a litio por sobre-expresión, y se ha demostrado que, al menos en parte, esta tolerancia se debe a una reducción en la toma de estos cationes tóxicos. Recíprocamente, se ha visto también que las células que no expresan los genes *HAL4* y *HAL5* son más sensibles a sodio, litio y otros cationes tóxicos que las células silvestres (Mulet et al., 1999). Hal4 y Hal5 se diferencian de la mayor parte de proteínas que se han identificado previamente como mediadoras de la tolerancia a sodio y a litio, ya que su habilidad para mediar esta halotolerancia no depende de la ATPasa exportadora de cationes monovalentes *Ena1*. En lugar de ello, las evidencias genéticas y fisiológicas apuntan a que las quinastas Hal4 y Hal5 modulan la actividad del principal sistema de transporte de potasio de las células de levadura, *Trk1-Trk2*, y por tanto, y de forma indirecta, también modulan la toma de cationes tóxicos como el sodio (Mulet et al., 1999).

Hay algunas evidencias previas que apoyan este mecanismo de homeostasis iónica. Se ha observado que el mutante *hal4hal5* no crece en medios con niveles de potasio bajos, y que tiene niveles más bajos de toma de rubidio que la cepa silvestre. 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*. Todo ello sugiere que las quinastas Hal4 y Hal5 son efectores positivos necesarios para la función normal del sistema de transporte de potasio *Trk1-Trk2* (Mulet et al., 1999).

Como paso previo a este trabajo se ha intentado hacer un análisis bioquímico de la interacción entre las quinastas Hal4 y Hal5 y el sistema de transporte de potasio *Trk1-Trk2*, pero no se ha logrado obtener ningún resultado positivo. Se ha intentado determinar la localización subcelular de la quinasa Hal5 mediante la utilización de fusiones Hal5-GFP, pero la quinasa Hal5 deja de expresarse al fusionarle la proteína GFP. También se ha intentado comprobar si hay una interacción física entre Hal5 y *Trk1* mediante fusiones de doble híbrido,

pero Hal5 también pierde su expresión en este tipo de fusiones. Se han realizado ensayos de co-inmunoprecipitación con Hal5 y Trk1, pero se han obtenido siempre resultados negativos, y lo mismo ha pasado en todos los ensayos de fosforilación *in vitro* que hemos intentado llevar a cabo con Hal5.

Todos estos resultados negativos nos han llevado a profundizar en la caracterización fisiológica del mutante *hal4hal5* con el objetivo de identificar nuevos fenotipos que nos puedan servir de ayuda para determinar los mecanismos de acción y las dianas de las quinasas Hal4 y Hal5.

II. OBJETIVOS

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

1. Realizar un análisis transcriptómico y fisiológico de un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que carece de dos quinasas importantes para la halotolerancia, Hal4 y Hal5, con el fin de elucidar nuevos mecanismos de regulación de la homeostasis iónica.
2. Estudiar de qué forma actúan las quinasas Hal4 y Hal5 sobre el sistema de transporte de potasio de alta afinidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Trk1-Trk2.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo y manipulación celular.

1.1. Bacterias.

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* se utilizó como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. Las células bacterianas se crecieron a 37°C en el 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. 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 $\mu\text{g/ml}$).

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 crecieron 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 cepa (30 $\mu\text{g/ml}$ adenina, 100 $\mu\text{g/ml}$ triptófano, 30 $\mu\text{g/ml}$ histidina, 100 $\mu\text{g/ml}$ leucina, 30 $\mu\text{g/ml}$ metionina, 30 $\mu\text{g/ml}$ uracilo). También se ha utilizado en algunos experimentos un medio mínimo con fuentes alternativas de nitrógeno. Este medio contenía 2% glucosa, 0,2% de yeast nitrogen base sin aminoácidos y sin sulfato amónico, y 0,1% de prolina o 30 mg/ml de urea según el experimento a realizar. En algunos casos los medios YPD y SD han sido suplementados con diferentes compuestos a las concentraciones indicadas. Para los experimentos realizados a pH 4.5 se suplementó el medio YPD con 50 mM 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	<i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2,3, 112 trp1-1 ura3-1</i>	Goosens et al. (2000)
<i>trk1 trk2</i>	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	Mulet et al. (1999)
<i>hal4 hal5</i>	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i>	Mulet et al. (1999)
<i>hal4 hal5 npi1</i>	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3 npi1::URA3</i>	
W303 [YCp- <i>TRK1-GFP</i>]	W303-1A [p414- <i>TRK1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YEp] [YCp- <i>TRK1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [YEp352] [p414- <i>TRK1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>HAL5</i>] [YCp- <i>TRK1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pUN50- <i>HAL5</i>] [p414- <i>TRK1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YEp- <i>HAL5</i>] [YCp- <i>TRK1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [YEp352- <i>HAL5</i>] [p414- <i>TRK1-GFP</i>]	
W303 [YEp- <i>CAN1-GFP</i>]	W303-1A [pVTU100- <i>CAN1-GFP</i>]	
W303 [YEp- <i>HXT1-GFP</i>]	W303-1A [pVTU100- <i>HXT1-GFP</i>]	
W303 [YCp- <i>FUR4-GFP</i>]	W303-1A [pYCplac33- <i>FUR4-GFP</i>]	
W303 [YCp- <i>GAP1-GFP</i>]	W303-1A [pYCp- <i>GAP1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YEp- <i>CAN1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pVTU100- <i>CAN1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YEp- <i>HXT1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pVTU100- <i>HXT1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>FUR4-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pYCplac33- <i>FUR4-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>GAP1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pYCp- <i>GAP1-GFP</i>]	
<i>trk1 trk2</i> [YEp- <i>CAN1-GFP</i>]	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i> [pVTU100- <i>CAN1-GFP</i>]	
<i>trk1 trk2</i> [YEp- <i>HXT1-GFP</i>]	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i> [pVTU100- <i>HXT1-GFP</i>]	
<i>trk1 trk2</i> [YCp- <i>FUR4-GFP</i>]	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i> [pYCplac33- <i>FUR4-GFP</i>]	
<i>trk1 trk2</i> [YCp- <i>GAP1-GFP</i>]	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i> [pYCp- <i>GAP1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5 SUR7-GFP</i>	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3 SUR7-GFP::URA3</i>	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1-HA</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1Δ35</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1Δ35-HA</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>URA3</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pUN50]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRP1</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>URA3</i>] [YCp- <i>TRP1</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pUN50] [p414]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1</i>] [YEp- <i>CAN1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1-HA</i>] [pVTU100- <i>CAN1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1</i>] [YEp- <i>HXT1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1-HA</i>] [pVTU100- <i>HXT1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1</i>] [YCp- <i>FUR4-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1-HA</i>] [pYCplac33- <i>FUR4-GFP</i>]	

<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1Δ35</i>] [YEp- <i>CAN1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1Δ35-HA</i>] [pVTU100- <i>CAN1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1Δ35</i>] [YEp- <i>HXT1-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1Δ35-HA</i>] [pVTU100- <i>HXT1-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [YCp- <i>TRK1Δ35</i>] [YCp- <i>FUR4-GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [p414- <i>TRK1Δ35-HA</i>] [pYCplac33- <i>FUR4-GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [pHluorin] [YCp- <i>TRK1</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pYPGE15-pHluorin] [p414- <i>TRK1-HA</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [pHluorin] [YCp- <i>TRK1Δ35</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pYPGE15-pHluorin] [p414- <i>TRK1Δ35-HA</i>]	
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]	
W303 [mt <i>GFP</i>]	W303-1A [pVTU100-mt <i>GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [mt <i>GFP</i>]	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i> [pVTU100-mt <i>GFP</i>]	
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 [pHluorin]	BY4741 [pYPGE15-pHluorin]	
<i>hal4 hal5</i> [pHluorin]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [pYPGE15-pHluorin]	
BY4741 [p180]	BY4741 [p180]	
<i>hal4 hal5</i> [p180]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [p180]	
BY4741 [mt <i>GFP</i>]	BY4741 [pVTU100-mt <i>GFP</i>]	
<i>hal4 hal5</i> [mt <i>GFP</i>]	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i> [pVTU100-mt <i>GFP</i>]	

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

1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos).

Realizamos diluciones seriadas de cultivos líquidos de distintas cepas de levadura y transferimos 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 incubamos las placas 2 ó 3 días a 28°C. En el análisis del crecimiento tuvimos en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observa crecimiento como el tamaño de colonia.

1.2.2. Ensayos de crecimiento de medio líquido.

La capacidad de crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó a lo largo del tiempo registrando el crecimiento de cultivos realizados en microplacas mediante un analizador Bioscreen C (Thermo LabSystems). Medimos la densidad óptica con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. La temperatura de crecimiento fue de 28,5 °C y los cultivos fueron sometidos a agitación vigorosa durante los 20 segundos previos a la lectura de absorbancia. Se realizó una lectura cada 20 minutos durante las 24, 48 ó 72 horas que duró el experimento. Los datos fueron corregidos para hacer comparables las lecturas del analizador con absorbancias reales a 660 nm de cultivos crecidos en condiciones óptimas, y para corregir la pérdida de linealidad de las absorbancias a partir de determinados valores (Warringer y Blomberg, 2003).

2. Técnicas de transferencia génica.

2.1. Transformaciones en bacteria.

Para las transformaciones de bacterias utilizamos un protocolo estándar de transformación por choque térmico (Hanahan, 1986). Mezclamos entre 0,1 y 1 ng de plásmido con 100 μ l de bacterias competentes. 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 añadimos 600 μ l de medio LB e incubamos a 37 °C en agitación 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 un protocolo estándar de transformación con acetato de litio (Gietz et al., 1995). Las células de levadura (recientemente crecidas en medio YPD sólido durante 24 horas) se mezclaron con entre 0,1 y 10 μ g del DNA a introducir en ellas, y se añadió 5 μ l de una solución de DNA monocatenario (0,1%) y 500 μ l de solución PLATE (40% PEG-4000, 100 mM de acetato de litio, 10 mM Tris pH 7.5, 0,4 mM 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 (1 minuto a 13000rpm). Finalmente las células se resuspendieron en 200 μ l de agua estéril y se extendieron en placas de medio selectivo.

3. Técnicas de manipulación genética.

3.1. Generación de plásmidos.

La construcción de los plásmidos *TRK1*-hemagglutinin (HA) y *TRK1-green fluorescent protein* (GFP) se ha descrito previamente (Yenush et al., 2005). El alelo *Trk1Δ35* se construyó de forma similar. Se generó un fragmento de PCR PstI/NdeI correspondiente al extremo C-terminal del gen *TRK1* utilizando el sitio interno PstI y el cebador 5'-TAATATCTCGAG**CATATG**CA-TTGGGTCTTCTGTATTGGT-3'. El sitio NdeI utilizado para la clonación se indica con letra en negrita.

Para la construcción de los plásmidos YCp-*HAL5* y YEp-*HAL5* se insertó un fragmento genómico que contenía la pauta de lectura abierta del gen *HAL5* (SphI/SacI), 500 pares de bases del promotor y 250 pares de bases del terminador en el vector centromérico pUN50 o en el vector multicopia YEp352 (Hill et al., 1986).

Para la construcción del plásmido pYPGE15-*pHluorin* se insertó un fragmento genómico que contenía la pauta de lectura abierta de una versión modificada (*pHluorin*) del gen que codifica la proteína GFP (XhoI) en el vector pYPGE15 de forma no direccional. Posteriormente se comprobó la correcta orientación de la inserción mediante digestiones con la enzima de restricción NdeI y se seleccionaron los clones positivos.

Los siguientes plásmidos fueron cedidos amablemente por el profesor Widmar Tanner (Universidad de Regensburg, Alemania): pVTU100-*CAN1-GFP*, pYCplac33-*FUR4-GFP*, pVTU100-*HXT1-GFP* y *SUR7-GFP* (Grossmann et al., 2006; Malinska et al., 2003). El plásmido Gap1-GFP (centromérico, con promotor endógeno) fue cedido por el Dr. Bruno André (Universidad Libre de Bruselas, Bélgica).

El plásmido pVTU100-mtGFP (Westermann y Neupert, 2000) se utilizó para los estudios morfológicos de la mitocondria. Este plásmido contiene una fusión de la región

codificante de la proteína GFP, y de los primeros 69 aminoácidos de la subunidad 9 de la ATPasa F_0 de *Neurospora crassa* (pVTU100 – mtGFP).

El plásmido p180 se utilizó para los estudios de actividad de la ruta GCN. Este plásmido deriva del vector YCp50, un plásmido de bajo número de copias que contiene el gen *URA3*, y contiene también la fusión del promotor del gen *GCN4* (4 ORFs) con el gen *lacZ* (Yang et al., 2000).

3.2. Generación de la cepa mutante *hal4hal5npi1*.

La cepa mutante *hal4 hal5 npi1* se construyó utilizando un fragmento generado por PCR que contenía el gen *URA3* de *Kluyveromyces lactis*, flanqueado por secuencias diseñadas para crear una disrupción parcial del promotor del gen *RSP5* (sustituyendo la secuencia desde -800 pares de bases a -500 pares de bases) después de la integración, y mimetizando de esta forma el efecto de la mutación *npi1* como ha sido descrito previamente (Hein et al., 1995). La integración correcta del fragmento de PCR se comprobó mediante reacciones de PCR sobre DNA genómico.

4. Obtención de extractos proteicos.

4.1. Obtención de extractos proteicos de la célula completa.

Para la obtención de extractos proteicos, las células se crecieron hasta fase logarítmica y se recogieron 20 ml de cultivo por centrifugación (3000 rpm durante 5 minutos). A continuación se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con agua estéril. Después se resuspendieron las células en 30 μ l de tampón de carga Laemmli 2,5X (3,8% SDS, 0,05 M ditioneitrilol, 5 mM EDTA, 15% sacarosa, 0,125 mg/ml azul de bromofenol, 0,15 M Tris-HCl ajustado a pH 6.8) y se incubaron a 95°C durante 5 minutos.

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

Para la obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble (fraccionamiento celular) las células se crecieron hasta fase logarítmica y se recogieron 20 ml de cultivo por centrifugación (3000 rpm 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 de 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 (2000 rpm durante 5 minutos a 4 °C). El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se centrifugó para separar las proteínas solubles de las insolubles (13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C). Las proteínas de la fracción insoluble (precipitado) se resuspendieron en 30 μ l de tampón de carga Laemmli 2,5X (3,8% SDS, 0,05 M ditioneitrilol, 5 mM EDTA, 15% sacarosa, 0,125 mg/ml azul de bromofenol, 0,15 M Tris-HCl ajustado a pH 6.8).

5. Electroforesis y técnicas de detección de proteínas.

5.1. Electroforesis de proteínas.

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 al 6%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0,1%) y una zona inferior de separación (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 al 8%, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0,1%). La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a 50 V, mientras que para la segunda parte (resolución) se utilizó 100 V. El tampón de electroforesis utilizado fue SDS-PAGE 1X (0,19 M glicina, 0,1% SDS, pH 8.3 ajustado con Tris).

5.2. Transferencia a membrana.

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas fueron transferidas 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, 20% metanol, pH 8.3 ajustado con Tris). La transferencia se realizó a 100 V durante 1,5 horas a 4°C.

5.3. Tinción de membranas con Ponceau S.

Esta técnica se utilizó para comprobar la eficiencia de la transferencia a la membrana y en algunos casos como control interno de carga (Korotzer et al., 1961). Se sumergieron las membranas en la solución colorante (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.

5.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.

En primer lugar se bloquearon todos los sitios de unión no específicos utilizando una solución de bloqueo (0,1 % Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 2% leche desnatada) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario a una dilución específica para cada caso (Tabla 3.2), y se dejó incubando durante 16 horas a 4°C en agitación. Luego se realizaron 4 lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 (0,1 % Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6). Después de los lavados se añadió el anticuerpo secundario a una dilución adecuada (Tabla 3.2) en TBS-Tween 20 y se dejó incubando durante 1 hora en agitación. Después se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
α -Pma1	1:20000	α -HRP-rabbit	1:5000
α -GFP	1:5000	α -HRP-mouse	1:10000
α -HA	1:10000	α -HRP-mouse	1:5000
α -Hal5	1:200	α -HRP-rabbit	1:5000

Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados en este trabajo. En esta Tabla se describen los anticuerpos que se han utilizado durante la realización del presente trabajo. También se describe la dilución en la que se ha utilizado cada uno de estos anticuerpos.

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

En los casos en los que fue necesaria la reutilización de las membranas, se incubaron durante 30 minutos a 50°C en un tampón que contenía 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS y 62,5 mM Tris-HCl pH 6.7, y después de una serie de lavados, se reincubaron con otro anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

6. Genómica funcional.

6.1. Extracción de RNA de levaduras.

Cultivos de 50 ml de cada una de las cepas a estudiar se crecieron hasta fase exponencial (10^7 células/ml) en YPD pH 4.5. Se recogieron las células por centrifugación (3000 rpm durante 5 minutos) y se congelaron inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido. Una vez congeladas se guardaron a -80°C .

Las células se resuspendieron en 2 ml de agua estéril, se pasaron a 2 microtubos estériles y se añadió a cada microtubo 700 μl de tampón TCES (0,2 M Tris pH 8, 0,2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS), 700 μl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y aproximadamente 1 ml de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Las células se rompieron por agitación utilizando un agitador automático durante 2 minutos. Se dejó enfriar la mezcla durante 10 minutos a 4°C y se volvió a agitar otros 2 minutos. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm y se pasó la fase superior a microtubos nuevos. Se añadió a cada microtubo 600 μl de cloroformo-isoamílico (24:1), se mezcló por agitación y se volvieron a centrifugar los microtubos 1 minuto a 13000 rpm. Se paso la fase superior a microtubos nuevos, se añadió a cada uno 600 μl de LiCl 6 M, y se dejó precipitando durante toda la noche. El día siguiente se centrifugaron los microtubos durante 15 minutos a 13000 rpm se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70%. Por último se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 30 μl de agua estéril.

Antes de empezar con los marcajes, se realizó una limpieza de los RNAs utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2. Marcaje de los RNAs de levadura.

El marcaje de los RNAs se realizó utilizando un método de marcaje indirecto. Se partió de 30 μg de RNA total. Se realizó una retrotranscripción utilizando como cebador un oligo-dT, para copiar los RNAs mensajeros en forma de cDNA de cadena sencilla, en la que

se incorporaron nucleótidos modificados (5-(3-aminoalil)-2-deoxi-UTP). La síntesis de cDNA se realizó a 50°C durante un mínimo de 3 horas utilizando la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen). El cDNA obtenido fue purificado utilizando columnas Qiaquick (Qiagen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Seguidamente se llevó a cabo el acoplamiento de los fluoróforos, Cy3 o Cy5 Dye NHS-éster (Amersham Biosciences). Este acoplamiento es una reacción química de unión entre los grupos aminoalil del cDNA y los grupos NHS-éster de los fluoróforos. Una vez acoplados los fluoróforos se volvió a purificar el cDNA utilizando las columnas Qiaquick. Finalmente se comprobó el marcaje utilizando un medidor de fluorescencia (Nanodrop ND 1000, Thermo Scientific).

6.3. Hibridación de las micromatrices.

Las micromatrices de cDNA utilizadas en este trabajo fueron cedidas por el Dr. Joaquin Ariño, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Universitat Autònoma de Barcelona).

La prehibridación de las micromatrices se realizó sumergiéndolas durante 45 minutos en solución de prehibridación (0,1% SDS, 5X SSC, 1% BSA) a 42°C. Las micromatrices se hibridaron con los cDNA marcados en solución de hibridación (0,1% SDS, 5X SSC, 50% formamida, 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmón) utilizando cámaras de hibridación (Telechem) durante toda la noche a 42°C. Tras lavar las micromatrices con una serie de diluciones de SSC y SDS, se escanearon para obtener las imágenes digitales correspondientes.

6.4. Análisis de las micromatrices.

Las imágenes digitales correspondientes a cada una de las hibridaciones se registraron a través de un escáner especial (Axon Instruments) utilizando una resolución de 10 µm. Posteriormente las imágenes fueron analizadas y normalizadas utilizando el programa GenePix 4.0 (Axon Instruments). Sólo se seleccionaron aquellos puntos cuya intensidad fuera mayor que 2 veces la media de la señal de fondo en al menos uno de los

dos canales. La normalización y el análisis de los datos se realizaron utilizando los programas Acuity 4.0 (Axon Instruments) y SAM (Tusher et al., 2001). En todos los casos, sólo se consideró un gen diferencialmente regulado cuando su expresión fue al menos 1,5 veces mayor o menor que la expresión en la situación control, y cuando había resultado positivo en los estudios de estadísticos de significación (FDR < 5%).

6.5. Análisis Northern.

El RNA se extrajo como se ha descrito en los apartados anteriores. Aproximadamente, se separaron 20 µg de RNA para cada una de las muestras, en una electroforesis en geles de agarosa al 1% con un 2.2% de formaldehído, y se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham). Las sondas se marcaron radiactivamente utilizando un método de cebado aleatorio. El método se basa en la hibridación de hexanucleótidos aleatorios en tampón OLB (5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.02 M MES ajustado a pH 6.8 con Tris, 0.02 mM dATP, 0.02 mM dGTP, 0.02 mM dTTP) con la sonda que debe ser marcada. La hebra de DNA complementaria es sintetizada por el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I, utilizando los oligonucleótidos aleatorios como cebadores, y utilizando un nucleótido marcado radiactivamente (³²P-dCTP) en lugar del equivalente no radiactivo en la reacción. Para la preparación de la sonda para la hibridación, el fragmento de DNA marcado se desnaturalizó a 95°C durante 10 minutos, se mezcló con 5 µl de OLB 5X, 2.5 µl de albúmina de suero bovino (1 mg/ml BSA), el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (10 U, Roche) y 20 µCi de ³²P-dCTP. Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante un mínimo de 6 horas, se paró añadiendo 25 µl de solución de STOP 2X (10 mM EDTA pH 8, 1% SDS) y se incubó a 95°C durante 10 minutos. La hibridación de las membranas se realizó en tampón PSE (300 mM fosfato sódico pH 7.2, 7% SDS y 1mM EDTA) a 65°C durante toda la noche. Como control de carga de RNA se hibridaron las membranas con una sonda del gen *ACT1*.

7. Otras medidas fisiológicas.

7.1. Medidas *in vivo* del pH interno de las células de levadura.

Para la determinación del pH intracelular de las células de levadura se utilizó una versión modificada de la proteína verde fluorescente (GFP) llamada pHluorin. Concretamente se utilizó la versión "*Ratiometric pHluorin*", que contiene las mutaciones S202H, E132D, S147E, N149L, N164I, K166Q, I167V, R168H y L220F (Miesenbock et al., 1998), con lo que cambia su espectro de emisión en función del pH. Las cepas de interés se transformaron con el plásmido pYPGE15 que a su vez contenía una copia del gen pHluorin, y se crecieron hasta fase logarítmica en medio SD suplementado con 0,2 M de KCl y los aminoácidos necesarios para el crecimiento de cada cepa. Para determinar el pH durante el ayuno de potasio las células se diluyeron en medio SD sin KCl y se incubaron durante 2 horas. La medida de la intensidad de la fluorescencia se llevó a cabo utilizando un fluorímetro (Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50B). Se determinaron las intensidades de emisión fluorescente a 395 y 475 nm y se calculó el cociente $I_{395/475}$ para cada muestra. La curva de calibrado se obtuvo incubando las células en 3 ml de un medio de calibración que contenía 50 mM MES, 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 50 mM NaCl, 0,2 M acetato amónico, 10 mM NaN_3 , 10 mM 2-deoxyglucosa, 75 μM monensina y 10 μM nigericina, ajustado a 8 valores diferentes de pH desde 4,5 a 8 utilizando NaOH (Miesenbock et al., 1998). Se realizaron las medidas de fluorescencia y se calculó el cociente de intensidades $I_{395/475}$ para cada una de las muestras de calibrado. Con estas medidas se obtuvo la curva de calibrado con la que posteriormente obtuvimos las medidas de pH para cada muestra.

7.2. Medidas del número de células y del tamaño celular.

Para las medidas del número de células de un cultivo y del tamaño celular se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento. Tras una breve sonicación (5 segundos, 0,8 ciclos, 80 de amplitud) se midió el número y el tamaño de las células con el contador Particle Coulter Counter and Size Analyzer Z2 (Coulter). El método que este aparato utiliza para contar las células y medir su tamaño se basa en los cambios medibles

de resistencia eléctrica que producen las partículas no conductoras en suspensión en un electrolito. Las partículas pasan a través de un sensor entre dos electrodos desplazando un volumen de electrolito igual al suyo. El volumen desplazado puede medirse en forma de un impulso eléctrico que es proporcional al volumen de la partícula.

7.3. Ensayos de actividad β -galactosidasa.

Para investigar la actividad transcripcional y traduccional del gen GCN4 en determinadas condiciones, se crecieron células transformadas con el plásmido p180 (ver generación de plásmidos) hasta fase logarítmica y se recogieron las células contenidas en 1,1 ml de cultivo por centrifugación. Las células se resuspendieron en 110 μ l de GTED (20% glicerol, 10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8, 1mM DTE). Se utilizaron 10 μ l de la muestra para medir la densidad óptica a 660 nm, y el resto de muestra se trató con 6 μ l de TET (1 volumen de tolueno, 1 volumen de Triton X-100 10%, 4 volúmenes de etanol) para permeabilizar las membranas celulares y permitir la entrada del sustrato. 10 μ l de células permeabilizadas se mezclaron con 190 μ l de tampón Z (0,1 M fosfato sódico pH 7, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoetanol), se añadió 40 μ l de ONPG (4 mg/ml o-nitrofenil- β -galactosidasa en fosfato sódico 0,1 M pH 7) y se dejó la reacción a 28°C hasta que las muestras adoptaron una coloración amarillenta. Para parar la reacción se añadieron 100 μ l de Na₂CO₃. Finalmente se midió la absorbancia a 415 nm de las muestras y se calculó la actividad β -galactosidasa en función de la absorbancia a 415 nm, el tiempo de reacción y la absorbancia a 660 nm (Miller, 1972; Serrano et al., 1973).

7.4. Medidas de potasio por HPLC.

Las medidas de potasio por cromatografía líquida de alta presión se llevaron a cabo utilizando una columna IC-Pak™ Cation M/D y un detector de conductividad Waters 432. La elución se realizó utilizando un flujo isocrático de 0,1 mM EDTA y 3 mM HNO₃ (resistencia=18,2 megohm/cm) como fase móvil. Las cepas de interés se crecieron en medio rico o selectivo hasta fase logarítmica y se recogieron 1,2 ml de células por centrifugación. Se resuspendieron en 600 μ l de agua estéril, se utilizaron 100 μ l de esta muestra para medir

la absorbancia a 660 nm y el resto se procesa para el experimento. Se extrajeron los iones calentando las células a 95°C durante 15 minutos e incubando luego 10 minutos en hielo. El extracto resultante se centrifugó para eliminar los restos celulares y se inyectaron en la columna de intercambio 100 µl de una dilución adecuada de la muestra a estudiar. La concentración de cationes de cada una de las muestras se determinó comparando el área bajo el pico correspondiente con los valores de área obtenidos en un experimento de calibración (Mulet y Serrano, 2002). El programa utilizado para el procesamiento de los datos fue el Millennium 3.20 (Waters Corporation).

7.5. Medidas de toma de rubidio.

La toma de rubidio de la cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* se midió, en colaboración con el Dr. José Ramos, de la Universidad de Córdoba, por medio de técnicas de espectrometría de absorción atómica como se ha descrito previamente (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). La toma de rubidio en el mutante *hal4hal5* transformado con las distintas versiones de *TRK1*, o con *HAL5*, se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión como se ha descrito en el apartado anterior (Mulet y Serrano, 2002).

7.6. Medidas de toma de leucina y metionina en células de levadura.

Para las medidas de toma de leucina, las cepas indicadas se crecieron hasta fase logarítmica y se recogieron 50 ml de cultivo por centrifugación (3000 rpm durante 5 minutos). Las células se lavaron con agua estéril, se resuspendieron en 5 ml de medio SuGlu (50 mM ácido succínico pH 5.5, 2% glucosa) y se incubaron durante 20 minutos a 28°C. Se determinó el número de células de cada muestra utilizando un contador de partículas (Particle Count and Size Analyzer Z2, Coulter Inc.) y se empezaron las medidas de toma de leucina añadiendo a las células leucina marcada con ¹⁴C (American Radiolabelled Chemicals, St. Louis, Mo.) hasta una concentración final de 10 µM. Se recogieron muestras en los tiempos indicados, se separaron las células por filtración, y se dejaron secar los filtros durante toda la noche. El día siguiente se añadió a cada filtro 3 ml de cóctel de centelleo y se

midió la radiactividad utilizando un contador de centelleo (Pharmacia Wallac 1410). Posteriormente se calculó la toma en μmol de leucina por mg de células.

La determinación experimental de la toma de metionina se realizó siguiendo los mismos pasos pero utilizando metionina marcada con ^{14}C (American Radiolabelled Chemicals, St. Louis, Mo.).

7.7 Ensayos de actividad succinato-deshidrogenasa (SDH).

Los ensayos de actividad succinato-deshidrogenasa se realizaron en colaboración con Mar Martínez, del laboratorio del Dr. Markus Proft. La purificación de las mitocondrias y los ensayos de actividad succinato deshidrogenasa se realizaron según se ha descrito (Graham, 2003).

7.8. Microscopía confocal.

Las imágenes de fluorescencia de células vivas crecidas hasta fase exponencial se obtuvieron utilizando un microscopio confocal invertido Leica TCS SL con un objetivo 40X / 1.25 como se ha descrito previamente (Yenush et al., 2005).

7.9. Tinción de las vacuolas.

Las membranas vacuolares se tiñeron utilizando un fluoróforo lipofílico, N-(3-trietilamoniopropil)-4-(p-dietilaminofenil-hexatrienil)piridio dibromuro (FM 4-64, Molecular Probes Inc., OR), utilizando un protocolo que incluía algunas modificaciones con respecto al que se había descrito previamente (Vida y Emr, 1995). Se creció un cultivo de 15 ml de la cepa de interés hasta fase logarítmica, se recogieron las células por centrifugación y se lavaron 2 veces con agua estéril. La muestra se resuspendió en medio mínimo suplementado con potasio a una densidad óptica a 660 nm de 0,3. Se extrajo una alícuota de 500 μl y se trató con 7 μl de FM 4-64 (2 mg/ml en dimetil sulfóxido) y tampón PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ácido etanosulfónico) hasta una concentración de 20 mM, y se incubó en oscuridad a

28°C durante 90 minutos. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1,5 ml de agua estéril para eliminar el exceso de colorante, se resuspendieron en 1 ml de medio mínimo sin potasio y se incubaron durante 2 horas para permitir la entrada del fluoróforo y la tinción de las membranas vacuolares. Por último se observó la fluorescencia por microscopía confocal con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de detección de entre 620 y 660 nm, como había sido descrito previamente (Yenush et al., 2005).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

PARTE I: Análisis fisiológico y transcriptómico del mutante *hal4hal5* de *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Ensayos de crecimiento en medio líquido del mutante *hal4hal5*.

El primer paso en la caracterización fisiológica del mutante *hal4hal5* fue la realización de una serie de ensayos de crecimiento en medio líquido. Se ha comparado el crecimiento del mutante *hal4hal5* con el de la cepa silvestre en diversos medios de crecimiento, y utilizando dos fondos genéticos distintos (Figura 4.1).

En el medio mínimo SD puede observarse que, en el fondo W303, el mutante *hal4hal5* no es capaz de crecer. Si se suplementa el medio con potasio (0.2 M KCl) se observa que el mutante presenta mejores niveles de crecimiento, aunque muy retrasado con respecto a la cepa silvestre en las mismas condiciones. En el fondo genético BY4741, menos sensible que el W303, puede observarse que el mutante *hal4hal5* es capaz de crecer en medio mínimo, incluso sin suplemento de potasio, aunque a un ritmo mucho más bajo que la cepa silvestre en las mismas condiciones. En este caso, al suplementar el medio de crecimiento con potasio se mejora el crecimiento del mutante, aunque en ningún caso alcanza los niveles de crecimiento de la cepa silvestre.

En medio rico YPD se puede ver que el mutante *hal4hal5* sigue creciendo a un ritmo más lento que la cepa silvestre, aunque las diferencias no son tan marcadas como las que se producen al crecer las cepas en medio mínimo. En el medio YPD, al añadir un suplemento de potasio en el medio de crecimiento, los niveles de crecimiento del mutante *hal4hal5* se acercan a los de la cepa silvestre, pero sin llegar nunca a crecer al mismo ritmo. En este caso, la única diferencia que se puede observar entre ambos fondos genéticos es una ligera mejora en el crecimiento de la cepa mutante *hal4hal5* en el fondo genético BY4741 al crecer en medio sin potasio añadido.

El hecho de que la cepa mutante *hal4hal5* no crezca al mismo ritmo que la cepa silvestre, incluso cuando se suplementa el medio con potasio, parece indicar que la falta de potasio no es el único problema fisiológico de esta cepa, lo que nos lleva a la búsqueda de nuevos fenotipos en el mutante *hal4hal5*.

Para encontrar nuevos fenotipos diferenciales entre el mutante *hal4hal5* y la cepa silvestre, se han buscado condiciones de crecimiento en las que se acentúen las diferencias entre ambas cepas. Basándonos en los resultados de distintos ensayos de crecimiento en medio líquido (datos no mostrados), se decidió que la mejor opción era realizar todas las comparaciones en células crecidas en un medio YPD ligeramente acidificado mediante la adición de ácido succínico (pH 4,5, ver Materiales y Métodos). En estas condiciones, como se ve en la figura 4.1, la diferencia de crecimiento entre ambas cepas es algo mayor de la que se observa en el caso de crecer las células en medio YPD sin acidificar. También se puede observar que en estas condiciones aumenta ligeramente el rendimiento de los cultivos. Probablemente esto es debido a la utilización por parte de las células del succinato como fuente de carbono.

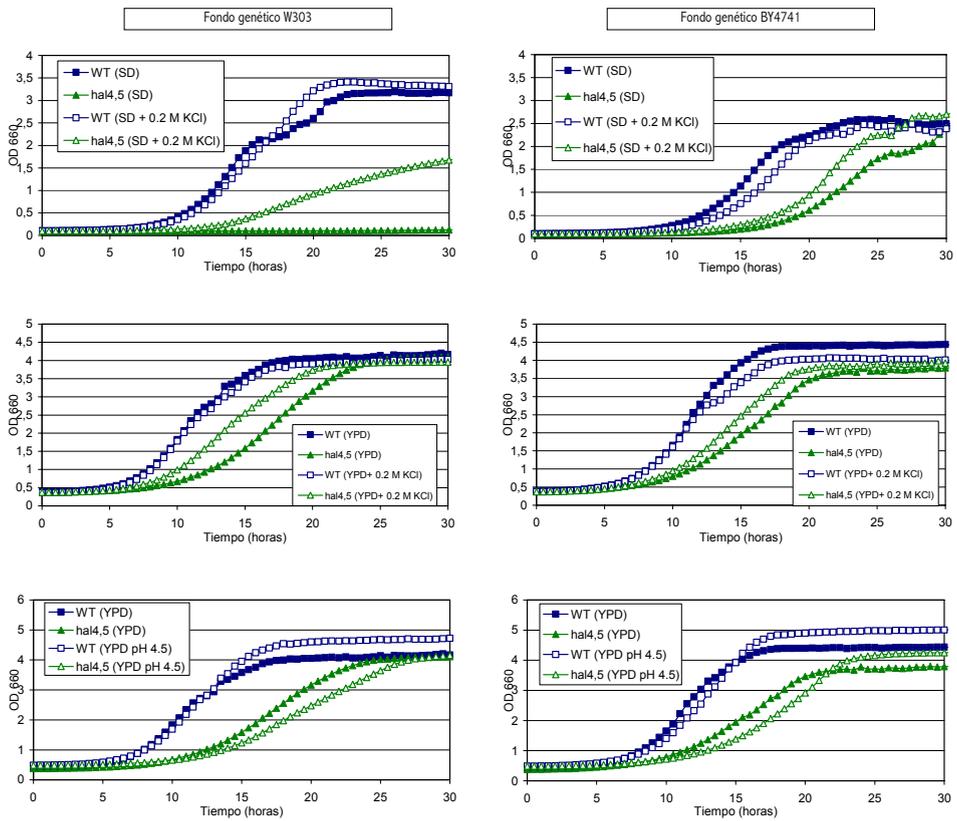


FIG. 4.1. Ensayos de crecimiento en medio líquido. Las cepas indicadas se crecieron hasta saturación en el medio que se indica en cada caso, y se inocularon en triplicado en medio nuevo utilizando una dilución 1:200. Las cepas se crecieron a 28 °C durante 48 horas y se midió la densidad óptica cada 30 minutos (ver Materiales y Métodos). Se registró la densidad óptica de muestras de medio sin inóculo durante el mismo periodo como control frente a posibles contaminaciones (datos no mostrados). Gráficas superiores: Registro del crecimiento de una cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* en medio mínimo SD sin potasio añadido (WT: ■; *hal4hal5*: ▲) o con un suplemento de 0.2 M KCl (WT: □; *hal4hal5*: △). Gráficas centrales: Registro del crecimiento de una cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* en medio rico YPD sin potasio añadido (WT: ■; *hal4hal5*: ▲) o con un suplemento de 0.2 M KCl (WT: □; *hal4hal5*: △). Gráficas inferiores: Registro del crecimiento de una cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* en medio mínimo YPD (WT: ■; *hal4hal5*: ▲) o en medio YPD acidificado a pH 4.5 mediante la adición de ácido succínico (WT: □; *hal4hal5*: △).

2. Medidas de la concentración interna de potasio en el mutante *hal4hal5*.

Todos los experimentos realizados previamente con el mutante *hal4hal5* apuntan a la hipótesis de que las quinasas Hal4 y Hal5 funcionan como reguladores positivos del sistema de transporte de potasio Trk1-Trk2. En trabajos previos llevados a cabo en el laboratorio, se comprobó que el mutante *hal4hal5* tiene niveles de toma de rubidio prácticamente idénticos a los del mutante *trk1trk2* (Mulet et al., 1999). Si esta hipótesis es acertada, sería lógico pensar que el mutante *hal4hal5* debe tener menores niveles internos de potasio que la cepa silvestre.

En primer lugar se midió, mediante HPLC, la concentración interna de potasio, tanto en el mutante *hal4hal5* como en la cepa silvestre, en células crecidas en medio mínimo con un suplemento de 0.2 M de potasio, y después de 2 horas de incubación en medio mínimo sin suplemento de potasio.

Cepa de levadura	Medio SD		Medio YPD	
	+ 0.2 M KCl	- 0.2 M KCl	pH 6.0	pH 4.5
WT	161 ± 11 mM	136 ± 7 mM	249 ± 29 mM	213 ± 9 mM
<i>hal4hal5</i>	162 ± 18 mM	92 ± 8 mM	165 ± 23 mM	141 ± 35 mM

Tabla 4.2. Concentración intracelular de potasio en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre. Las cepas indicadas (fondo genético W303) fueron crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con 0.2 M KCl, medio rico YPD o medio rico YPD pH 4.5 y se recogieron por centrifugación. En el caso del medio mínimo SD sin suplemento de potasio, las células fueron crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con 0.2 M KCl, se lavaron 2 veces con agua destilada, se resuspendieron en medio mínimo sin suplemento de potasio, se incubaron durante 2 horas a 28°C, y se recogieron como en los casos anteriores. La concentración intracelular de potasio se midió por HPLC como se describe en Materiales y Métodos.

Después de 2 horas de incubación en un medio sin suplemento de potasio se observa un descenso modesto en la concentración interna de potasio de la cepa silvestre (136 ± 7 mM vs. 161 ± 11 mM). Contrariamente, en el mutante *hal4hal5* la concentración interna de potasio cayó desde niveles próximos a los de la cepa silvestre (162 ± 18 mM) en

un medio suplementado con potasio, hasta 92 ± 8 mM después de 2 horas de incubación en un medio sin suplemento de potasio (Tabla 4.2).

Sin embargo, no se puede afirmar que existan diferencias a nivel de la concentración citosólica de potasio, ya que las medidas de potasio que se han obtenido son totales, y podría estar sucediendo que la concentración citosólica de potasio fuera la misma para ambas cepas y que se estuvieran produciendo cambios a nivel de la concentración vacuolar de potasio.

Se han medido también los niveles intracelulares de potasio en células crecidas en medio rico YPD, y en un medio rico con el pH ligeramente acidificado (YPD pH 4.5). También en este caso se puede observar como la concentración interna de potasio es menor en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre (165 ± 23 mM vs. 249 ± 29 mM), y se ve además que el contenido interno de potasio en ambas cepas disminuye ligeramente al crecer las células en un medio con el pH más ácido (Tabla 4.2).

3. Experimentos con una versión truncada de Trk1.

En un intento de definir el mecanismo molecular por el que Hal4 y Hal5 afectan a la actividad de Trk1 se construyó un mutante de delección *TRK1* que carece de los nucleótidos que codifican los últimos 35 aminoácidos. Esta región fue elegida en base a experimentos previos llevados a cabo en *Schizosaccharomyces pombe* que muestran que sólo un mutante de delección del extremo terminal-COOH, y no el homólogo de longitud completa de Trk1 es capaz de rescatar las células de la sensibilidad a sal causada por la mutación del homólogo de *HAL4* (Wang et al., 2005).

Se han examinado los fenotipos de crecimiento de cepas expresando esta versión truncada de Trk1. La versión truncada de Trk1, y no la proteína completa, es capaz no sólo de complementar la sensibilidad a sal y pH bajo del mutante *hal4hal5*, sino que también confiere tolerancia a concentraciones tóxicas de LiCl en medio YPD (Figura 4.3 - A). La versión truncada de Trk1 también mejora el crecimiento del mutante *hal4hal5* en medio

mínimo sin suplemento de potasio. Sin embargo, el mutante *hal4hal5* expresando esta versión de Trk1 no crece tan bien como la cepa silvestre en medio mínimo, lo que indica que el rescate es sólo parcial.

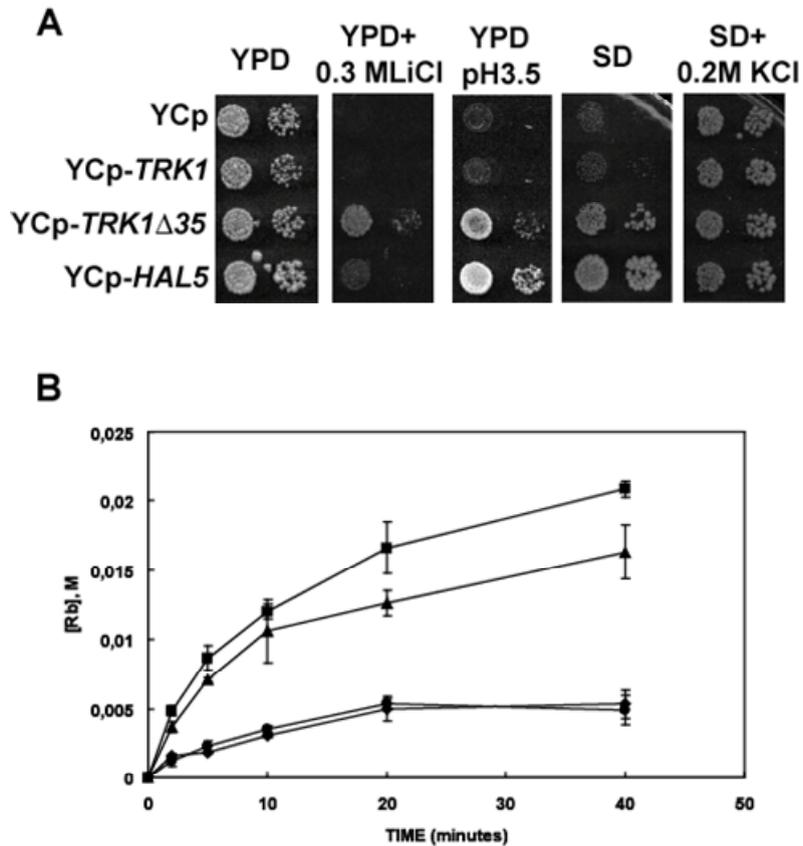


FIG. 4.3. Análisis de los fenotipos del mutante *hal4hal5* expresando una versión truncada de Trk1 (A). El mutante *hal4hal5* (fondo genético W303) transformado con los plásmidos indicados se creció hasta saturación en medio mínimo suplementado con potasio, se diluyó en serie y se depositó en placas con los medios indicados. Se midió el crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28°C. (B) Las cepas indicadas (mutante *hal4hal5* (fondo W303) transformado con el vector vacío [◆], el gen *TRK1* completo [●], *TRK1Δ35* [▲], o *HAL5* [■]) se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio, se lavaron y se incubaron durante 2 horas en medio de bajo potasio. La toma de rubidio fue medida por cromatografía líquida de alta presión, como se describe en Materiales y Métodos, utilizando 5 mM RbCl.

También se midió la toma de rubidio de la versión truncada de Trk1 en el mutante *hal4hal5*. Como puede verse en la figura 4.3 - B, la expresión del vector vacío o de la versión silvestre de *TRK1* no mejora el defecto en la toma de rubidio del mutante *hal4hal5*. Sin embargo, la versión truncada de Trk1 produce una toma de rubidio similar a la de la cepa mutante expresando una copia del gen *HAL5* bajo el control de su propio promotor. Por tanto, bajo estas condiciones experimentales, la versión truncada de Trk1 restablece la toma de rubidio del mutante *hal4hal5* a niveles cercanos a los de la cepa silvestre, por lo que se puede afirmar que la presencia de *HAL4* o *HAL5* no es necesaria para la activación de esta versión truncada del transportador de potasio Trk1.

4. Medidas *in vivo* del pH intracelular en el mutante *hal4hal5*.

Se ha descrito que las alteraciones en el transporte de potasio pueden afectar al pH interno de las células (Yenush et al., 2002). En el caso del mutante *hal4hal5*, se ha comprobado que la concentración de potasio intracelular es menor que la encontrada en la cepa silvestre. Ante la necesidad de mantener la neutralidad eléctrica en las células, se podría estar produciendo algún tipo de regulación de la ATPasa de protones de la membrana plasmática Pma1 para evitar la salida excesiva de protones. Esto produciría un acumulo de protones en el mutante *hal4hal5*, y por tanto una acidificación intracelular.

Para determinar el pH intracelular del mutante *hal4hal5* y de la cepa silvestre, se transformaron las células con una versión modificada de la proteína verde fluorescente (GFP) llamada pHluorin (ver Materiales y Métodos) que cambia su espectro de emisión en función del pH interno de las células.

Utilizando este método se midió el pH intracelular en células crecidas en medio mínimo suplementado con potasio y en células mantenidas durante 2 horas en medio mínimo sin suplemento de potasio. No fue posible realizar medidas del pH intracelular en células crecidas en medio rico, ya que la auto-fluorescencia de este tipo de medio interfiere con la detección de la señal fluorescente de la proteína pHluorin.

En el fondo genético BY4741 se observa que el mutante *hal4hal5* tiene un pH interno más ácido que la cepa silvestre (6.46 ± 0.06 vs. 6.79 ± 0.17) cuando las células crecen en medio mínimo suplementado con potasio. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en el pH interno de cada cepa al pasar las células de un medio con suplemento de potasio, a medio mínimo sin suplemento de potasio (6.46 ± 0.06 vs. 6.47 ± 0.08 , para el mutante *hal4hal5*, y 6.79 ± 0.17 vs. 6.91 ± 0.10 , para la cepa silvestre) (Figura 4.4-B).

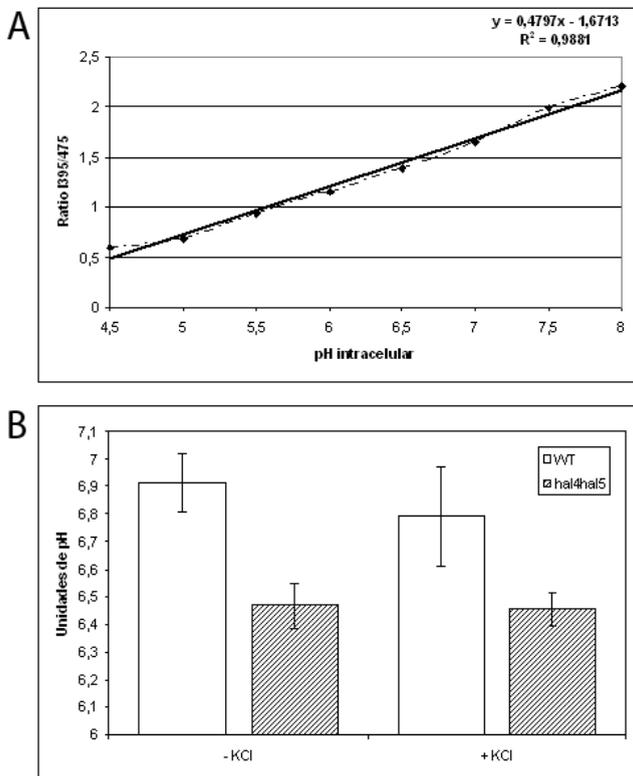


FIG. 4.4. Medidas de pH intracelular en el mutante *hal4hal5*. Las cepas indicadas (fondo genético BY4741) se crecieron por triplicado en medio mínimo suplementado con potasio hasta fase logarítmica, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en medio mínimo suplementado con 0.2 M KCl o medio mínimo sin suplemento de potasio. A continuación se determinó el pH intracelular de ambas cepas con el método pHluorin como se describe en Materiales y Métodos. (A) Curva y ecuación de calibrado obtenida para la determinación del pH intracelular del mutante *hal4hal5* y la cepa silvestre (ver Materiales y Métodos). (B) Medidas de pH intracelular obtenidas para el mutante *hal4hal5* (rayas) y la cepa silvestre (blanco) crecidos en medio mínimo suplementado con potasio (+KCl) y después de 2 horas de incubación en medio mínimo sin suplemento de potasio (-KCl).

En el apartado anterior se ha visto que la concentración intracelular de potasio del mutante *hal4hal5* era prácticamente igual a la de la cepa silvestre cuando crecíamos ambas cepas en medio suplementado con potasio (Tabla 4.2). En este experimento se puede ver que, en esas mismas condiciones, sigue existiendo una diferencia importante a nivel de pH interno entre el mutante *hal4hal5* y la cepa silvestre. Por otra parte, a pesar del descenso que se ha visto que se produce en la concentración intracelular de potasio al pasar el mutante *hal4hal5* de un medio suplementado con potasio a un medio sin suplemento de potasio, apenas hay cambios a nivel de pH en el mutante *hal4hal5* después de someter las células a un ayuno de potasio.

También se han realizado estos mismos experimentos utilizando el fondo genético W303 en lugar del BY4741, y se han obtenido resultados prácticamente idénticos (datos no mostrados).

Estos resultados parecen descartar los bajos niveles intracelulares de potasio como única causa de la acidificación interna del mutante *hal4hal5*.

Para estudiar la relación entre acidificación intracelular y la concentración interna de potasio, se midió el pH intracelular en el mutante *hal4hal5* transformado con un plásmido con la versión silvestre del gen *TRK1*, o la versión truncada *TRK1Δ35*. Como se ha comentado anteriormente, cuando el mutante *hal4hal5* expresa la versión truncada *TRK1Δ35*, crece mejor en medio mínimo no suplementado con potasio y no muestra sensibilidad a sal. Además, también se ha descrito como esta versión truncada de *TRK1* mejora la toma de rubidio del mutante *hal4hal5*, lo que nos hace suponer que en esas condiciones el mutante *hal4hal5* tiene mejores niveles de toma de potasio, y por tanto, una concentración intracelular de potasio mayor.

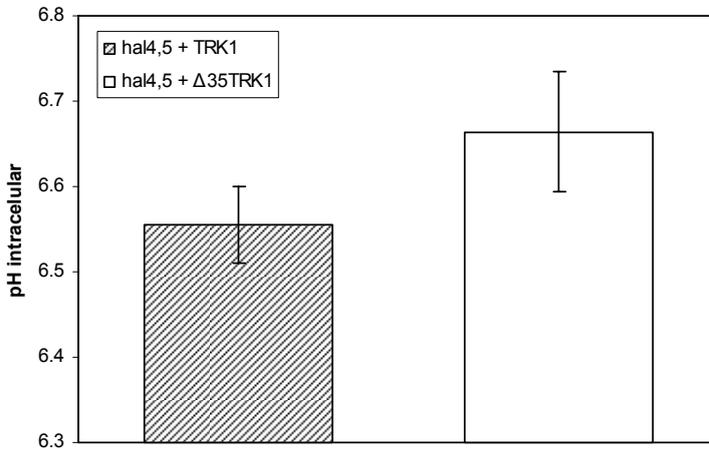


FIG. 4.5. Medidas de pH intracelular en el mutante *hal4hal5* expresando la versión silvestre de *TRK1* y la versión truncada *TRK1Δ35*. Las cepas indicadas (fondo genético W303) se crecieron por triplicado en medio mínimo suplementado con potasio hasta fase logarítmica y se recogieron las células por centrifugación. A continuación se determinó el pH intracelular de ambas cepas con el método pHluorin como se describe en Materiales y Métodos.

Si se compara el pH intracelular de la cepa mutante *hal4hal5* que expresa la versión silvestre de *TRK1* con el de la cepa que expresa la versión truncada *TRK1Δ35* (Figura 4.5), se observa que, aunque el pH es ligeramente más alto (aprox. 0.1 unidades) cuando se expresa la versión truncada de *TRK1*, las diferencias no son significativas.

5. Medidas de la toma de leucina en el mutante *hal4hal5*.

Se ha descrito que en las células de levadura, el funcionamiento de las permeasas de aminoácidos depende del gradiente de protones, por lo que su toma debe estar influenciada por la diferencia existente entre las concentraciones intracelulares y extracelulares de protones (Vallejo y Serrano, 1989). Como se ha visto anteriormente, el mutante *hal4hal5* presenta un pH intracelular considerablemente menor que el de la cepa silvestre, y parece lógico pensar que esta mayor concentración interna de protones podría estar dificultando la toma de aminoácidos en este mutante.

Para comprobar esta hipótesis se han llevado a cabo algunos ensayos de toma de leucina, tanto en el mutante *hal4hal5* como en la cepa silvestre. Como se puede ver en la figura 4.6, al crecer las células en medio rico YPD (pH 6.0), la toma máxima de leucina a los 10 minutos es alrededor de un 50 % menor en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre. La velocidad inicial de toma también es menor en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre. También se ha realizado este mismo experimento en células crecidas en YPD ajustado a pH 4.5. En estas condiciones, el menor pH del medio externo debería producir un incremento del gradiente de protones, favoreciendo la toma de aminoácidos. De acuerdo con este planteamiento, se puede observar un incremento considerable en la toma máxima de leucina a los 10 minutos en la cepa silvestre al crecer las células en YPD pH 4.5. Sin embargo, en el mutante *hal4hal5*, aunque también se produce un ligero aumento de la toma de leucina, es mucho menor del observado para la cepa silvestre. En estas condiciones, la velocidad de toma de leucina es aproximadamente la misma que en el experimento anterior (YPD pH 6.0).

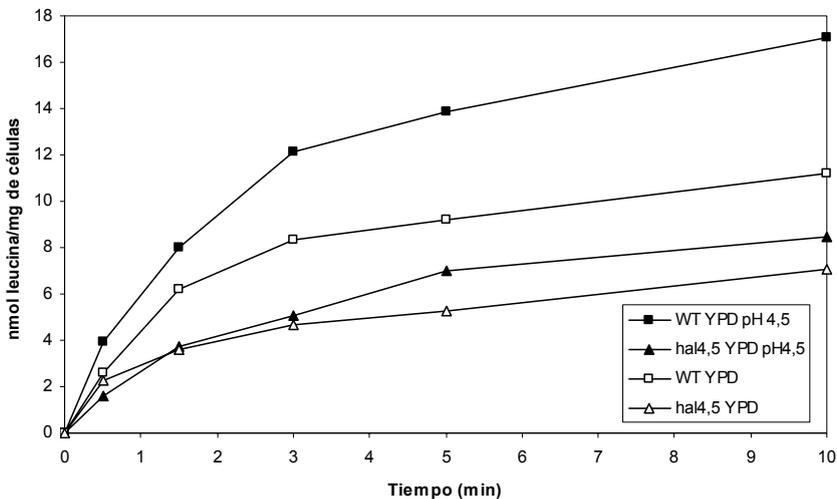


FIG. 4.6. Toma de leucina en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre en medio rico. Las cepas indicadas (fondo genético BY4741) se crecieron hasta fase logarítmica, se recogieron las células y se utilizaron en ensayos de toma de leucina como se describe en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron en medio YPD pH 6.0 (WT: □; *hal4hal5*: △) y medio YPD pH 4.5 (WT: ■; *hal4hal5*: ▲). Los datos se muestran en nmoles de leucina por mg de células. Los experimentos se han repetido hasta en 3 ocasiones, y los errores observados siempre han sido inferiores al 10%.

Por otra parte también se ha ensayado la toma de leucina en células crecidas en medio mínimo suplementado con potasio (0.2 M KCl), y después de 2 horas de incubación en medio mínimo sin suplemento de potasio (Figura 4.7). Al crecer las células en medio mínimo suplementado con potasio, el mutante *hal4hal5* presenta unos niveles de toma de leucina mucho menores que la cepa silvestre (en torno a un 75% menos de toma máxima de leucina a los 10 minutos en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre). La velocidad inicial de toma de leucina también es menor en el mutante que en la cepa silvestre. Tras incubar las cepas en un medio sin suplemento de potasio, la velocidad inicial de toma de leucina del mutante *hal4hal5* es más baja que en la misma cepa crecida en medio suplementado con potasio, aunque los niveles máximos de toma de este mutante a los 10 minutos son prácticamente idénticos en ambas condiciones. Este resultado está de acuerdo con las observaciones de pH intracelular que se han mostrado anteriormente. El pH intracelular del mutante *hal4hal5* es similar en células crecidas en medio mínimo suplementado con potasio que en células sometidas a un ayuno de potasio. Si el pH intracelular no cambia al someter las células a un ayuno de potasio, parece lógico pensar que el ayuno de potasio tampoco produzca cambios en los niveles de toma máxima de aminoácidos. La cepa silvestre tiene velocidades iniciales de toma de leucina muy parecidas en células crecidas en medio suplementado con potasio y en medio sin suplemento de potasio, y los niveles máximos de toma de leucina a los 10 minutos en ambas condiciones son también muy parecidos.

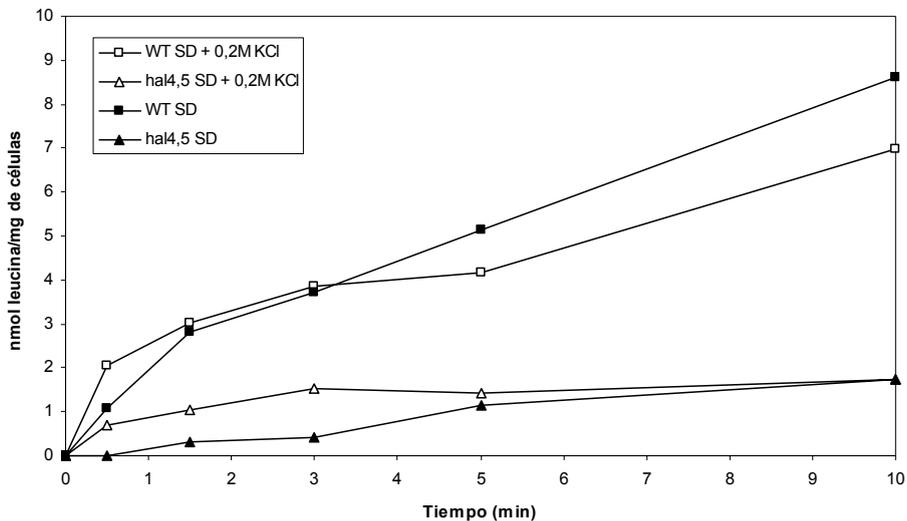


FIG. 4.7. Toma de leucina en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre en medio mínimo. Las cepas indicadas (fondo genético BY4741) se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo SD suplementado con 0,2 M KCl, se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua. A continuación las células se incubaron durante 2 horas en medio mínimo suplementado con potasio (WT: □; *hal4hal5*: △) y medio mínimo sin suplemento de potasio (WT: ■; *hal4hal5*: ▲), y se utilizaron en ensayos de toma de leucina como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se muestran en nmoles de leucina por mg de células. Los experimentos se han repetido hasta en 3 ocasiones, y los errores observados siempre han sido inferiores al 10%.

Es importante destacar que aunque todos los resultados que se muestran aquí se han obtenido en experimentos en los que se ha utilizado el fondo genético BY4741, todos ellos han sido confirmados utilizando también el fondo genético W303 (datos no mostrados).

Estos resultados apuntan hacia la hipótesis de que la reducción en la toma de aminoácidos que presenta el mutante *hal4hal5* en comparación con la cepa silvestre, que se puede observar incluso después de suplementar el medio de crecimiento con potasio, podría ser una de las causas de la menor tasa de crecimiento de esta cepa.

6. Medidas de la actividad de la ruta GCN en el mutante *hal4hal5*.

El descenso en los niveles de toma de algunos aminoácidos que se ha descrito anteriormente para la cepa mutante *hal4hal5* podría producir en estas células un ayuno de aminoácidos. Para investigar esta posibilidad se han observado 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, 1996).

Para analizar los niveles de actividad de la ruta GCN, se transformaron las células de la cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* con el plásmido p180, que contiene una fusión del promotor del gen *GCN4* y el gen *lacZ*. La formación del complejo de traducción en el promotor del gen *GCN4* se ve incrementada en caso de producirse ayuno de algún aminoácido.

Se determinaron los niveles de actividad β -galactosidasa en ambas cepas transformadas con el plásmido p180 (ver Materiales y Métodos). Al crecer las células en YPD se observó una mayor actividad β -galactosidasa en la cepa *hal4hal5* que en la cepa silvestre, con independencia del fondo genético utilizado (Figura 4.8). Estos resultados indican que la cepa mutante *hal4hal5* presenta de forma constitutiva una mayor actividad de la ruta GCN que la cepa silvestre, lo que probablemente esté reflejando que esta cepa está sufriendo algún tipo de ayuno de aminoácidos.

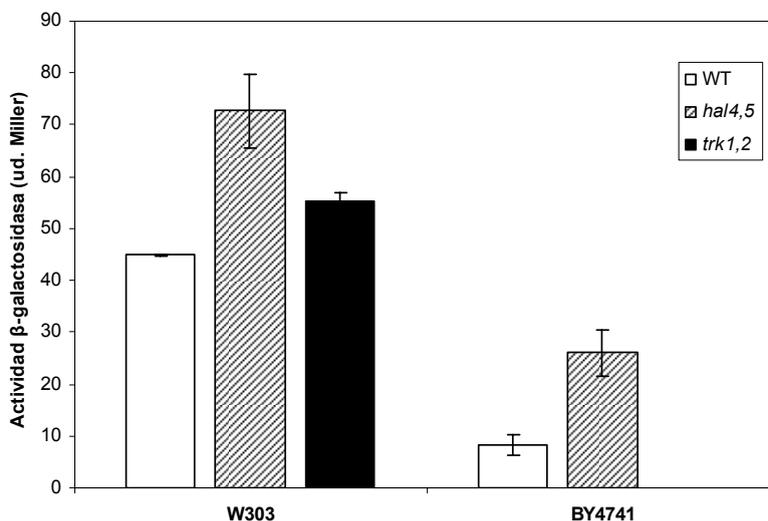


FIG. 4.8. Actividad de la ruta GCN en células crecidas en medio rico YPD. Se crecieron las células de las cepas indicadas en medio YPD hasta fase logarítmica, se recogieron por centrifugación y se midió la actividad β -galactosidasa. Se midieron los niveles de la actividad β -galactosidasa en las cepas *hal4hal5*, *trk1trk2* y silvestre en el fondo genético W303, y en las cepas *hal4hal5* y silvestre en el fondo genético BY4741.

También se midió la actividad β -galactosidasa en la cepa *trk1trk2* (fondo genético W303). Esta cepa carece del sistema de transporte de potasio de alta afinidad TRK, pero tiene las quinasas Hal4 y Hal5 funcionales, por lo que nos puede servir para distinguir los efectos relacionados con la falta de potasio, con los ocasionados directamente por la ausencia de las quinasas. En esta cepa se observó un nivel de actividad enzimática intermedio entre los observados para la cepa silvestre y la cepa mutante *hal4hal5* (Figura 4.8). Este resultado sugiere que el ayuno observado para el mutante *hal4hal5* es debido tanto a las bajas concentraciones intracelulares de potasio de este mutante, como a la ausencia de las quinasas.

Además se midió la actividad β -galactosidasa en ambas cepas en células crecidas en medio rico acidificado. En estas condiciones de crecimiento vemos que, aunque sigue habiendo más actividad en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre, la diferencia entre ambas es considerablemente menor (Figura 4.9). Probablemente, en este tipo de medio, con

una mayor concentración de protones, se ve favorecida la toma de nutrientes, y el ayuno de aminoácidos del mutante *hal4hal5* debe ser menor.

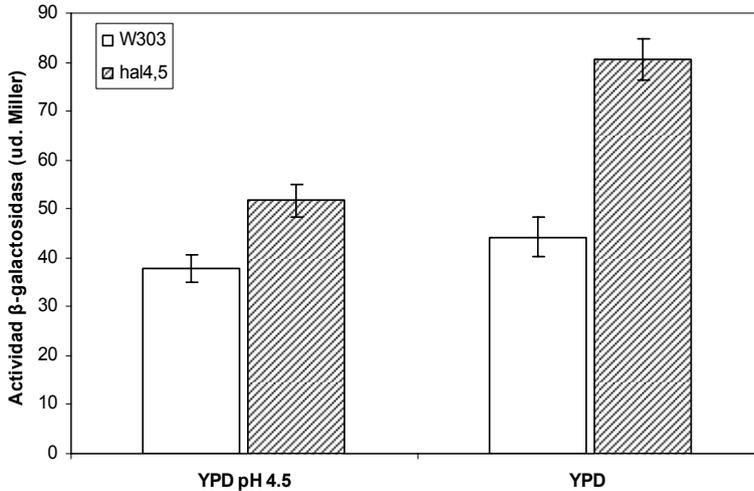


FIG. 4.9. Actividad de la ruta GCN en células crecidas en medio rico YPD pH 4.5 y medio rico YPD. Se crecieron las células de las cepas indicadas (fondo genético W303) en medio YPD acidificado hasta pH 4.5, y en medio YPD hasta fase logarítmica, se recogieron por centrifugación y se midió la actividad β -galactosidasa.

7. Análisis transcriptómico del mutante *hal4hal5*.

Otro abordaje que nos puede ayudar en la caracterización del mutante *hal4hal5* es el estudio de su transcriptoma.

Para identificar los genes cuya expresión está afectada por la disrupción de los genes *HAL4* y *HAL5* se han comparado los perfiles de transcripción de la cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* en dos fondos genéticos: W303 y BY4741. Para llevar a cabo estas comparaciones se realizaron unos experimentos de análisis global de la expresión génica por medio de microarrays de DNA. Los microarrays de DNA que se han utilizado en estos experimentos han sido impresos en la Universidad Autónoma de Barcelona, y cedidos amablemente por el Dr. Joaquín Ariño. En estos microarrays están representados 6275 clones, que cubren el genoma completo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para comparar los niveles de expresión génica en el mutante *hal4hal5* y la cepa silvestre, se han buscado condiciones de crecimiento en las que se acentúen las diferencias entre ambas cepas. Basándonos en los resultados de distintos ensayos de crecimiento en medio líquido, se decidió que la mejor opción era realizar las comparaciones de los niveles de expresión génica en células crecidas en un medio YPD ligeramente acidificado (pH bajado a 4,5 mediante la adición de ácido succínico, ver Materiales y Métodos). En estas condiciones, como se ha visto anteriormente (Figura 4.1), la diferencia de crecimiento entre ambas cepas es algo mayor de la que se observa al crecer las células en medio YPD sin acidificar, lo que probablemente va a permitir detectar una mayor cantidad de genes expresados diferencialmente. Por tanto, para la realización de estos experimentos de análisis de expresión génica se crecieron ambas cepas hasta fase logarítmica en medio YPD pH 4,5, se extrajo el RNA y se prepararon las sondas para la hibridación de los microarrays (ver Materiales y Métodos).

Se realizaron dos experimentos independientes, uno para cada uno de los dos fondos genéticos. El diseño experimental elegido en ambos casos fue un *Balanced Block Design* (Simon y Dobbin, 2003) con 4 réplicas biológicas, dos de ellas con los marcajes invertidos (*dye-swaps*). Una vez realizados los experimentos y obtenidos los datos de expresión para cada uno de los genes, se utilizó el programa SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) (Tusher et al., 2001) para seleccionar los genes con cambios de expresión significativos. Los criterios que se han seguido para seleccionar los genes diferencialmente expresados han sido que hayan pasado el test estadístico SAM con un FDR (*false discovery rate* o probabilidad de seleccionar genes que no estén diferencialmente expresados) menor del 5,5 % y que tengan una expresión en el mutante *hal4hal5* al menos 1,5 veces en valor absoluto mayor o menor de la que tienen en la cepa silvestre.

En el fondo genético W303 se han seleccionado 457 genes con niveles de expresión más altos en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre, y 252 genes con menores niveles de expresión en la cepa *hal4hal5* que en la cepa silvestre. En el fondo genético BY4741 el grupo de genes expresados diferencialmente fue menor. En este caso se seleccionaron 194 genes con mayores niveles de expresión en el mutante *hal4hal5* que en la

cepa silvestre y 66 genes con un nivel de expresión mas bajo en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre.

	Genes inducidos en el mutante <i>hal4hal5</i> con respecto a la cepa silvestre	Genes reprimidos en el mutante <i>hal4hal5</i> con respecto a la cepa silvestre
Fondo genético W303	457	252
Fondo genético BY4741	194	66
Coincidentes en ambos fondos	139 (~70%)	40 (~60%)

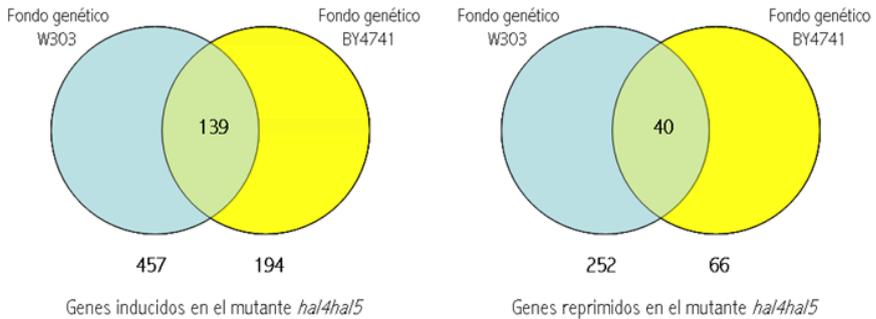


FIG. 4.10. Comparación entre el número de genes inducidos y reprimidos en el mutante *hal4hal5* en los fondos genéticos BY4741 y W303. Los genes seleccionados como expresados diferencialmente han pasado el test estadístico SAM con un FDR menor del 5,5 % y tienen una expresión en el mutante *hal4hal5* al menos 1,5 veces mayor o menor de la que tienen en la cepa silvestre.

Como se puede ver en la figura 4.10, a pesar de que el número de genes expresados diferencialmente en el mutante *hal4hal5* 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 *hal4hal5* en el fondo genético BY4741 también han sido seleccionados como inducidos en este mutante en el fondo genético W303. Con los genes cuya expresión está reprimida en el mutante *hal4hal5* se han obtenido unos niveles de coincidencia semejantes. En torno al 60% (40 de 66) de los genes que han sido

seleccionados como reprimidos en el mutante *hal4hal5* en el fondo genético BY4741, están también reprimidos en este mutante en el fondo genético W303.

Se ha realizado también un análisis de estos genes en base a las categorías funcionales a las que pertenecen. Se ha utilizado 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 nuestras listas de genes, tanto inducidos como reprimidos.

En el fondo genético BY4741 se ve que aparecen sobre-representadas de forma significativa (p -value calculado por el algoritmo GO $< 0,01$) en la lista de genes inducidos en el mutante *hal4hal5* varias categorías funcionales, relacionadas con el metabolismo energético y con la asimilación de sulfato. En el fondo genético W303, donde la lista de genes inducidos era mayor, se encuentran sobre-representadas estas mismas categorías funcionales, y además han aparecido otras nuevas, que se relacionan con el metabolismo de carbohidratos y la respuesta a estrés (Tabla 4.11).

Entre los genes que aparecen reprimidos en el mutante *hal4hal5*, en el fondo BY4741 aparecen sobre-representadas de forma significativa categorías funcionales relacionadas con el metabolismo de nucleótidos, más en concreto con la biosíntesis de adenina, y categorías relacionadas con el metabolismo de aminoácidos. También ha aparecido sobre-representada de forma significativa, aunque en menor medida (sólo han aparecido reprimidos 3 genes, *SIT1*, *FTR1* y *FET3*), la categoría funcional de asimilación de hierro. En el fondo genético W303, entre los genes reprimidos en el mutante *hal4hal5* también se observa una sobre-representación de las categorías funcionales relacionadas con la biosíntesis de adenina y el metabolismo de aminoácidos, pero no aparece en este caso la categoría de asimilación de hierro. Por otra parte, además de las categorías ya mencionadas, entre los genes reprimidos en el mutante *hal4hal5* en este fondo genético también se encuentran sobre-representadas algunas categorías funcionales relacionadas con la biogénesis de ribosomas y la biosíntesis de ergosterol (Tabla 4.12).

Los experimentos se han llevado a cabo en fondos genéticos con distintos genotipos en cuanto a la dependencia de adenina y metionina para descartar que los efectos observados fueran debidos a las auxotrofias propias de la cepa mutante. El fondo genético W303 es *ade2 MET15* y el fondo genético BY4741 es *ADE2 met15*, y a pesar de ello se han obtenido prácticamente los mismos resultados en ambos casos.

Fondo genético W303	Fondo genético BY4741
<p>Metabolismo energético</p> <p>Biosíntesis de ATP AIP1, AIP3, AIP16, INH1, AIP5, TIM11, AIP17, STP2, AIP2, AIP7, AIP18, AIP19, AIP4, AIP15, AIP20</p> <p>Respiración aeróbica COR1, ETR1, KGD2, SDH4, COX2D, OCR7, OCR6, OCR9, LSC2, OCR10, COX16, OCR8, MDH1, MBR1, SDH2, RSF1, ISF1, POR1</p> <p>Transporte de electrones SDH4, OCR7, OCR6, OCR9, OCR10, COX5E, OCR8, MCR1, SDH2, CYB2, NDI1</p> <p>Asimilación de sulfatos</p> <p>Biosíntesis de metionina MET10, MET13, STR3, GTO1, TRX2, YHR12C, MET28, GTT1, MET3, EGM17, MET14, MET1, EGM4, MET17, GLO1, MET16</p>	<p>Metabolismo energético</p> <p>Biosíntesis de ATP AIP1, AIP3, AIP16, INH1, AIP5, TIM11, AIP17, STP2, AIP2, AIP7, AIP18, AIP4, AIP15, AIP20</p> <p>Respiración aeróbica PET9, COR1, SDH4, OCR7, RIF1, COX4, COX13, OCR10, OCR8, MDH1, SDH1, SDH2, ISF1, POR1, OCR2</p> <p>Transporte de electrones COX9, SDH4, OCR7, RIF1, COX4, OCR10, COX5, OCR8, SDH1, MCR1, SDH2, COX8, CYB2, NDI1, COX7, COX5A, CYT1, OCR2</p> <p>Asimilación de sulfatos</p> <p>Biosíntesis de metionina MET6, MET10, STR3, YHR12C, MET28, MET3, EGM17, MET14, MET1, EGM4, MET16</p>
<p>Metabolismo de carbohidratos</p> <p>Biosíntesis de trehalosa NTH2, TPS1, TPS2, UGP1, TSL1, FGM2, TPS3, ATH1</p> <p>Biosíntesis de glucógeno GLC3, GIP2, BMH1, YPII, PIG2, UGP1, GLG1, GSY2, FGM2, GLG8, GAC1, GDB1</p> <p>Catabolismo de alcohóles TAL2, GLK1, HXK1, HXK2, XKS1, SOL4, GRE3, PFK3, TDH1, YJR08W, YLR345W, DAK1, FGM2, GCY1, TYE7</p> <p>Catabolismo de monosacáridos TAL2, GLK1, HXK1, HXK2, XKS1, SOL4, GRE3, PFK3, TDH1, YJR08W, YLR345W, FGM2, GCY1, TYE7</p> <p>Respuesta a estrés FRZ2, APN2, PRX1, NTH2, UGA2, HSP26, TPS1, TDH1, GRX1, RVS161, HSP30, SSI2, TRX3, GPD1, RAD28, TPS2, HSP42, HSP78, GRC2, GCH4, PRE1, MOP1, BMH1, HSP12, GPC2, GCH4, PRE1, MOP1, BMH1, HSP12, GRE3, TRP2, IMP2, YJL144W, GRX1, MCR1, HSP104, AHP1, DAK1, TSL1, ALD3, DDR48, SIP18, GAO1, HOR7, TPS3, YGP1, DDR2, TR2, GCY1, GAC1, REV3, GRE1, ATH1</p>	

Tabla 4.11. Categorías funcionales sobre-representadas entre los genes seleccionados como inducidos en el mutante *hal4hal5* con respecto a la cepa silvestre en los fondos genéticos W303 y BY4741. Se utilizó la herramienta de análisis *GO Term Finder* de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* para identificar categorías funcionales sobre-representadas en la lista de genes seleccionados como inducidos. Los datos crudos contienen distintas subcategorías que en ocasiones agrupan los mismos genes. Aquí se muestra un resumen abreviado de esos datos crudos.

Fondo genético W303		Fondo genético BY4741	
Metabolismo de nucleótidos	ADE1, URA7, BNA4, HPT1, ADE8, ADE5 7, ADE6, IMD2, RPE1, NNT1, ADE13, IMD3, ADE17, GUA1, ADE4, ADE12, RK11, ADE2	Metabolismo de nucleótidos	
Biosíntesis de adenina		Biosíntesis de adenina	ADE1, ADE5 7, IMD2, ADE13, IMD3, ADE17
Metabolismo de aminoácidos	GCV3, HIS4, CHA1, LYS20, LYS4, ASP1, YDR341C, ARO10, HIS1, LEU1, SER2, ARO9, BATT1, LYS12, MAE1, AAT1, SAM1, GCV2, LYS9, LEU9, CDO80, SAM4, MRR1	Metabolismo de aminoácidos	HIS4, CHA1, LYS20, LEU1, ARO9, BATT1, ILV3, AAT1, ILV5, GCV2, ARG1, LEU9
Biosíntesis de ribosomas	ECM1, YLD54W, MIS1, SRO9, YLD63C, NOP14, RRP1, ARX1, BCP1, UTP5, TPA1, PPT1, ENP2, NSR1, SDA1, GAR1, NMD3, RIK1, YLD66C, YVH1, MTR4, URB1, DPH2, SRP40, SIK1, FPR4, RPLGA, ERB1, RRB1, DBP2, KRE33, AAH1, IPI3, RES4, TRM11, UTP23, RK11, YTM1, RPA43, NOG1, NANT1, DIM1, RPO82	Asimilación de hierro	SIT1, FTR1, FET3
Biosíntesis de ergosterol	ERG25, ERG11, ERG7, HMG1, ERG13, ERG2, MVD1		

Tabla 4.12. Categorías funcionales sobre-representadas entre los genes seleccionados como reprimidos en el mutante *hal4ha15* con respecto a la cepa silvestre en los fondos genéticos W303 y BY4741. Se utilizó la herramienta de análisis *GO Term Finder* de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* para identificar categorías funcionales sobre-representadas en la lista de genes seleccionados como reprimidos. Los datos crudos contienen distintas subcategorías que en ocasiones agrupan los mismos genes. Aquí se muestra un resumen abreviado de esos datos crudos.

Resulta interesante destacar que este mismo experimento también se llevó a cabo utilizando células crecidas en YPD sin acidificar (pH 6.0). En estas condiciones las categorías funcionales que aparecieron sobre-representadas entre los genes seleccionados como diferencialmente expresados fueron exactamente las mismas que habían aparecido en común en los dos experimentos anteriores. 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.

Por otra parte, es también interesante señalar que, tanto entre los genes inducidos como reprimidos, y en ambos fondos genéticos, ha aparecido un alto porcentaje (entre en 20% y el 30%) de genes cuya función biológica es desconocida.

8. Metabolismo aeróbico en el mutante *hal4hal5*.

En el análisis transcriptómico llevado a cabo se ha observado la inducción de varios grupos de genes relacionados con el metabolismo energético en el mutante *hal4hal5*. Parece que los genes relacionados con la respiración, el transporte de electrones y la biosíntesis de ATP se expresan más en el mutante que en la cepa silvestre. Ya hemos visto anteriormente que esta cepa tiene algunos problemas de toma de aminoácidos, lo que le conduce a un estado de ayuno. Existe la posibilidad de que el mutante *hal4hal5* también tenga problemas semejantes con el transporte de otros nutrientes, y haya tenido que desplazar su metabolismo hacia la respiración para optimizar la obtención de energía. En base a estas hipótesis, se decidió observar la morfología y la funcionalidad de la mitocondria tanto en el mutante *hal4hal5* como en la cepa silvestre.

Para observar las mitocondrias, se transformaron ambas cepas con un plásmido que contenía una fusión de la región codificante de la proteína GFP, y de los primeros 69 aminoácidos de la subunidad 9 de la ATPasa F_0 de *Neurospora crassa* (pVTU100 – mtGFP) (Westermann y Neupert, 2000). Estos 69 aminoácidos constituyen una secuencia de direccionamiento hacia la matriz mitocondrial que había sido caracterizada previamente (Hartl et al., 1989).

Ambas cepas fueron transformadas con esta construcción, se crecieron en YPD pH 4.5 hasta fase logarítmica y se observaron en el microscopio confocal. En ambas cepas se puede observar la forma característica de las redes tubulares de mitocondria funcional. Aunque cuantitativamente parece haber una mayor expresión de la fusión con la proteína GFP en el mutante que en la cepa silvestre, no se aprecian diferencias en la morfología de la mitocondria entre ambas cepas (Figura 4.13). Es importante destacar que aunque los resultados que se muestran en este trabajo se han obtenido en el fondo genético W303, todos ellos han sido confirmados también en el fondo genético BY4741.

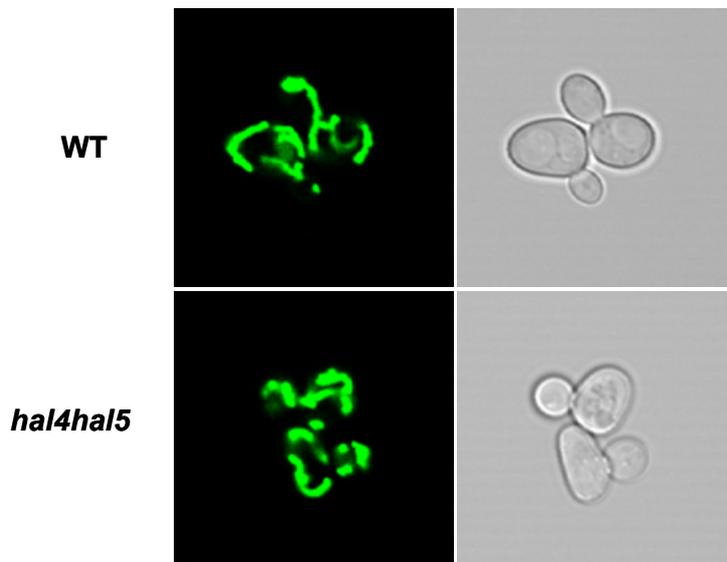


FIG. 4.13. Análisis de la morfología de la mitocondria en el mutante *hal4hal5* y la cepa silvestre. Se transformaron las cepas indicadas (fondo genético W303) con la construcción pVTU100 - mtGFP, se crecieron en YPD pH 4.5 hasta fase logarítmica y se observaron en el microscopio confocal.

Para estudiar un indicador de la funcionalidad de las mitocondrias en ambas cepas se midieron los niveles de actividad succinato deshidrogenasa (SDH) en colaboración con Mar Martínez, del grupo del Dr. Markus Proft. Como se puede observar en la figura 4.14, la cepa mutante *hal4hal5* tiene unos niveles de actividad succinato deshidrogenasa muy superiores a los de la cepa silvestre.

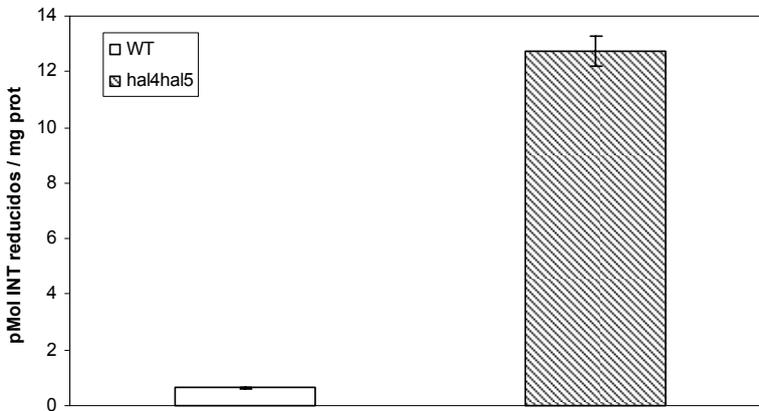


FIG. 4.14. Medidas de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH) en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre. Se crecieron las cepas indicadas (fondo genético W303) en YPD pH 4.5 hasta fase logarítmica, se recogieron las células y se llevaron a cabo los ensayos de actividad SDH como se describe en Materiales y Métodos. Las gráficas muestran la media y la desviación estándar del resultado de tres experimentos.

Estos resultados sugieren que el mutante *hal4hal5* tiene una mayor actividad respiratoria que la cepa silvestre, lo que estaría de acuerdo con la inducción de genes relacionados con el metabolismo energético que se ha observado en el análisis transcriptómico del mutante *hal4hal5*.

Para comprobar los niveles de expresión de los genes *SDH2* y *COX6* se ha llevado a cabo un análisis *Northern*. Como se puede observar en la figura 4.15, los niveles de expresión de estos dos genes son alrededor de 2 veces más altos en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre (Figura 4.15). Estos datos confirman los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico, donde estos genes habían sido seleccionados como inducidos en el mutante *hal4hal5* en comparación con la cepa silvestre, con unos niveles de inducción muy semejantes.

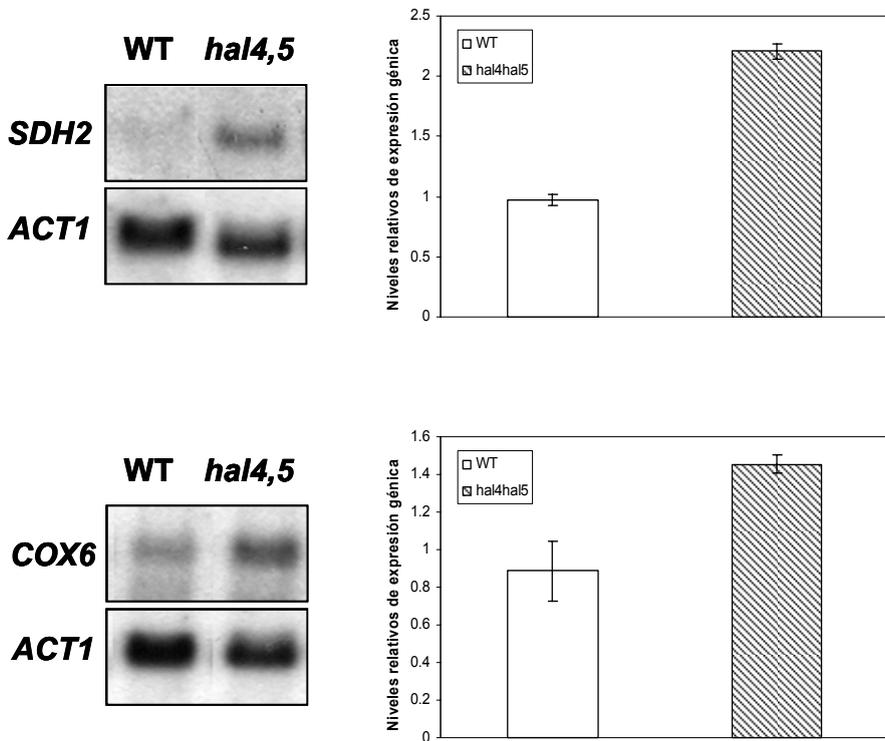


FIG. 4.15. Medidas de los niveles de expresión de los genes *SDH2* y *COX6* en el mutante *hal4,5* y en la cepa silvestre. Se extrajo el RNA total de las cepas indicadas (fondo genético W303) crecidas en medio YPD acidificado a pH 4.5. Se realizaron análisis *Northern* para determinar los niveles de RNAm de *SDH2* (arriba) y *COX6* (abajo) utilizando las sondas correspondientes (ver Materiales y Métodos). La membrana se rehibridó con una sonda contra *ACT1* como control de carga (paneles inferiores). A la derecha de cada experimento se muestran los resultados de la cuantificación de las imágenes obtenidas para cada análisis *Northern*.

9. Toma de metionina en el mutante *hal4,5*.

Otra de las categorías funcionales que ha aparecido sobre-representada entre los genes inducidos en el mutante *hal4,5* ha sido la de asimilación de sulfatos, y más concretamente la de biosíntesis de metionina. Como se ha visto en los apartados anteriores, el mutante *hal4,5* presenta un defecto en la toma de leucina. Existe la posibilidad de que este defecto sea más general, y afecte también a la asimilación de sulfatos o a la toma de metionina del medio. Para comprobar estas hipótesis se realizaron ensayos de crecimiento

en medio con bajos niveles de sulfato, pero sin obtener ningún resultado significativo (datos no mostrados). Un defecto en la toma de metionina podría explicar la inducción de los genes de biosíntesis que se ha observado en este mutante.

Para comprobar esta hipótesis se han realizado ensayos de toma de metionina en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre. Se crecieron las células hasta fase exponencial en YPD acidificado a pH 4.5, para mantener las condiciones en las que se ha llevado a cabo los análisis transcriptómicos. A continuación se recogieron las células por centrifugación, se lavaron y se realizaron los ensayos de toma de metionina como se describe en Materiales y Métodos.

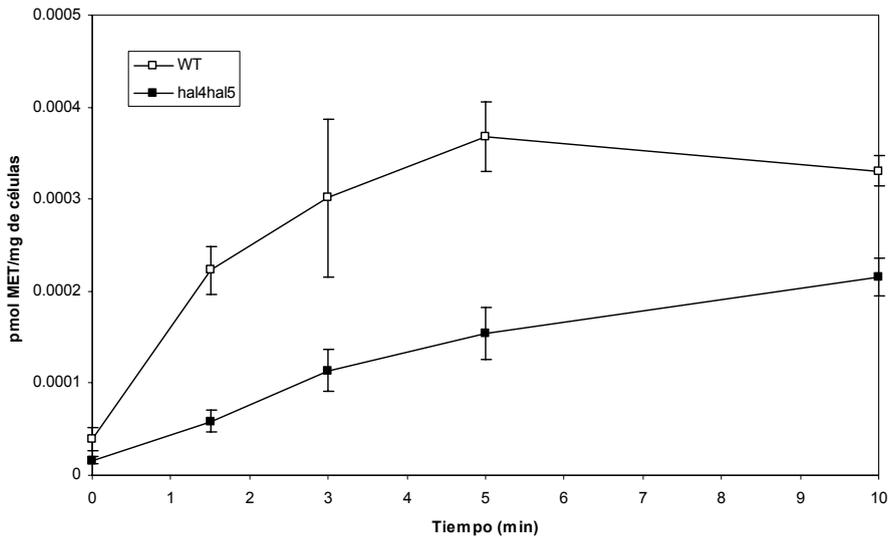


FIG. 4.16. Toma de metionina en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre. Las cepas indicadas (fondo genético W303) se crecieron hasta fase logarítmica, se recogieron las células y se utilizaron en ensayos de toma de metionina como se describe en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron en 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.

Como se puede ver en la figura 4.16, parece que el mutante *hal4hal5* 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. 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 *hal4hal5*.

IV. RESULTADOS

PARTE II: Estudio de la interacción entre las quinasas Hal4 y Hal5, y el sistema de transporte de potasio de alta afinidad Trk1-Trk2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Localización subcelular de la proteína Trk1 en el mutante *hal4hal5*.

En el capítulo anterior se ha descrito una caracterización fisiológica del mutante *hal4hal5*, pero, aunque se ha obtenido mucha información de la fisiología del mutante, no se ha obtenido ningún resultado que describa el mecanismo por medio del cual las quinasas Hal4 y Hal5 regulan el sistema de transporte de potasio TRK. En este capítulo se describen nuevos abordajes bioquímicos que se han llevado a cabo con la intención de averiguar los mecanismos de acción de Hal4 y Hal5.

Hay evidencias genéticas que sugieren que las quinasas Hal4 y Hal5 están implicadas en la regulación positiva del transportador de potasio Trk1 (Mulet et al., 1999). Sin embargo, los análisis *Northern* de los niveles de transcripción del gen *TRK1* muestran que la expresión de este gen es la misma en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre (datos no mostrados). Este resultado sugiere que la regulación de Trk1 por Hal4 y Hal5 no sucede a nivel transcripcional, lo que nos lleva a postular la hipótesis de que las quinasas Hal4 y Hal5 participan en el control de la actividad del transportador de potasio Trk1 por medio de modificaciones post-traduccionales.

Para estudiar la localización subcelular de Trk1, construimos una proteína de fusión Trk1-GFP en un plásmido centromérico. La función de esta construcción se confirmó por complementación de la sensibilidad a LiCl del mutante *trk1trk2* (datos no mostrados). Se crecieron la cepa silvestre y *hal4hal5* hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con 0,2 M de KCl. Esta concentración de KCl, aunque está muy por encima de las concentraciones fisiológicas, es necesaria para lograr un crecimiento óptimo del mutante *hal4hal5* en medio mínimo. Como estábamos interesados en estudiar el defecto que tiene lugar en el mutante *hal4hal5* en las condiciones estándar de crecimiento, se analizaron los fenotipos de este mutante después de una incubación en medio sin suplemento de potasio. Observamos los patrones de fluorescencia de GFP en células vivas después de una incubación en medio sin suplemento de potasio por microscopía confocal. Como puede verse en la figura 4.17 - A, la fusión Trk1-GFP está presente en la membrana plasmática de la cepa silvestre, como era de esperar. Sin embargo, en el mutante *hal4hal5*, se observa menos

Trk1-GFP en la membrana plasmática, y un aumento de la señal de fluorescencia de GFP en el interior de la vacuola en muchas células. Las membranas vacuolares se tiñeron utilizando el fluoróforo FM4-64 como había sido descrito previamente (Vida y Emr, 1995). Este descenso de la cantidad de Trk1 en la membrana plasmática puede explicar la dependencia de potasio del mutante *hal4hal5* que se ha descrito anteriormente, y la aparición de señal de GFP en el interior de las vacuolas sugiere que probablemente el transportador está siendo dirigido hacia las vacuolas para su degradación, como ya ha sido descrito anteriormente para otros transportadores de nutrientes (Beck et al., 1999; De Craene et al., 2001). Estos resultados se confirmaron por medio de análisis *Western* (Figura 4.17 - B). Se observa que la cantidad de proteína Trk1 presente en la fracción insoluble (asociada a la membrana plasmática) es mucho menor en el mutante *hal4hal5* después de transferirlo a un medio sin suplemento de potasio, en comparación con la cepa silvestre, sugiriendo una rápida degradación de la proteína Trk1 bajo estas condiciones. Por otra parte, es interesante destacar que en células crecidas en un medio suplementado con potasio se puede observar una cantidad considerable de la proteína Trk1 en la fracción insoluble. Por tanto, parece que las quinasas Hal4 y Hal5 son especialmente importantes para la estabilidad de Trk1 en un medio con concentraciones de potasio semejantes a las que se pueden encontrar en los medios típicos de cultivo (≈ 7 mM).

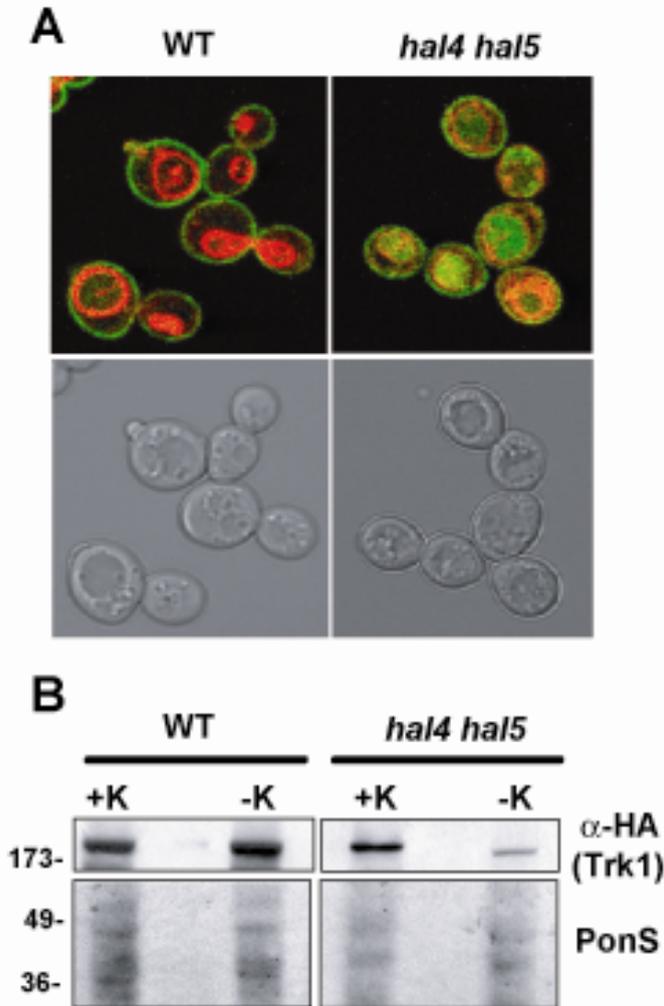


FIG. 4.17. Trk1 es menos estable en el mutante *hal4hal5* después del ayuno de potasio. (A) La cepa silvestre (WT) y el mutante *hal4hal5* expresando un plásmido centromérico que contiene una fusión *TRK1-GFP* se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio y se tiñeron con el fluoróforo vacuolar FM4-64 como se ha descrito en Materiales y Métodos. Se han mostrado imágenes en escala de grises e imágenes de fluorescencia representativas de las imágenes obtenidas por microscopía confocal para analizar la localización de Trk1 (verde) y las membranas vacuolares (rojo). (B) Análisis *Western* de los niveles de Trk1 en las fracciones insolubles de la cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* mantenidos en medio mínimo suplementado con potasio (+K) o incubadas en medio mínimo sin suplemento de potasio durante 2 horas (-K). Las imágenes de la membrana teñida con PonceauS se muestran en los paneles de abajo como control de carga de proteína.

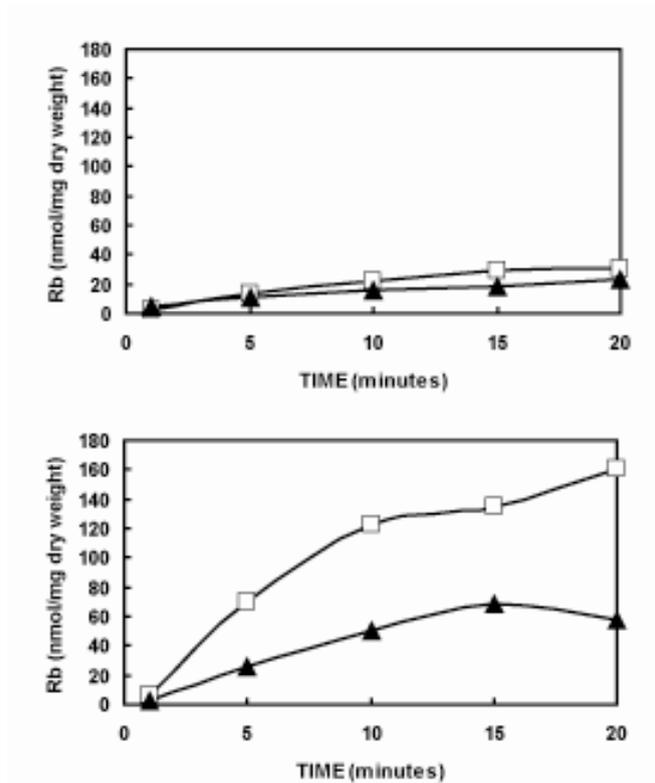


FIG. 4.18. Toma de rubidio en el mutante *hal4hal5* y en la cepa silvestre. La cepa silvestre (□) y el mutante *hal4hal5* (▲) fueron crecidos hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio y se realizó un análisis de toma de rubidio de alta afinidad (0,5 mM) inmediatamente después de lavar las células (panel superior) y después de 2 horas de incubación en medio de bajo potasio (panel inferior). Se obtuvieron resultados similares utilizando 50 mM RbCl.

En colaboración con el grupo del Dr. José Ramos, de la Universidad de Córdoba se analizó la toma de rubidio en estas mismas condiciones experimentales. Se crecieron las células hasta fase logarítmica en un medio mínimo suplementado con potasio, fueron lavadas y se ensayó la toma de rubidio. Inicialmente no se observa toma de rubidio en estas condiciones, lo que sugiere que el transportador de potasio Trk1 no está activo, debido a la inhibición *feed-back* por potasio intracelular alto (Serrano, 1991). Sin embargo, y como era de esperar, después de 2 horas de incubación en medio sin suplemento de potasio, se puede ver una tasa inicial de toma de rubidio más alta en la cepa silvestre que en el mutante *hal4hal5* (Figura 4.18). Este resultado está de acuerdo con datos previamente publicados

(Mulet et al., 1999) y con las observaciones de microscopía y análisis *Western* que se presentan en este trabajo. Este descenso en la toma de rubidio también está reflejado en las concentraciones internas de potasio. Después de 2 horas de incubación en un medio sin suplemento de potasio se observa un descenso modesto en la concentración interna de potasio de la cepa silvestre (136 ± 7 mM vs. 161 ± 11 mM). Contrariamente, en el mutante *hal4hal5* la concentración interna de potasio cayó desde niveles próximos a los de la cepa silvestre (162 ± 18 mM) en un medio suplementado con potasio, hasta 92 ± 8 mM después de 2 horas de incubación en un medio sin suplemento de potasio, reflejando el defecto en la actividad de Trk1 debido a la baja estabilidad del transportador en la membrana plasmática en estas condiciones. Postulamos que la toma de potasio independiente de Trk1 se debe a sistemas de toma de baja afinidad, como canales no selectivos, que parecen funcionar independientemente de Hal4 y Hal5 (Bihler et al., 2002).

2. Efecto de la presión osmótica sobre la estabilidad y/o localización del transportador Trk1 en el mutante *hal4hal5*.

A continuación se comprobó si la inestabilidad del transportador Trk1 que se veía en el mutante *hal4hal5* después del ayuno de potasio podía deberse a un cambio en la presión osmótica generado al quitar el potasio del medio, o si era un efecto específico del potasio en sí. Se midieron los niveles de proteína Trk1-GFP mediante análisis *Western* en cepas crecidas en presencia de 0,2 M KCl y luego transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio, o a medio suplementado con 0,2 M KCl o 0,2 M NaCl (Figura 4.19 - A). En la cepa mutante *hal4hal5* que expresa el gen *HAL5* por medio de un plásmido centromérico no se observan cambios en los niveles de proteína Trk1-GFP cuando las células se incuban en presencia de potasio o sodio. Como se había visto antes, en el mutante *hal4hal5* podemos ver cantidades considerables de Trk1 cuando se crecen las células en presencia de un exceso de KCl (0,2 M). Estos niveles de proteína no se mantienen cuando el potasio se sustituye por sodio. Se han apoyado estas observaciones con análisis por microscopía confocal de la fusión Trk1-GFP en la cepa mutante *hal4hal5* comparándola con la cepa complementada con el plásmido YCp-*HAL5* después de incubar las células en medio mínimo o medios suplementados con 0,2 M KCl, 0,2 M NaCl ó 0,3 M de

sorbitol (Figura 4.19 - B). No se aprecian cambios en la distribución de Trk1 en la cepa mutante complementada con el plásmido YCp-*HAL5*. Por el contrario, en el mutante *hal4hal5* la fusión Trk1-GFP se acumula en la vacuola en los medios suplementados con NaCl o sorbitol, mientras que es estable en la membrana plasmática si se mantiene el suplemento de KCl en el medio. Estos resultados sugieren que la mayor estabilidad de Trk1 en presencia de 0,2 M KCl en el mutante *hal4hal5* no se debe a los cambios en la presión osmótica causados por pasar las células a un medio con un contenido de potasio mucho menor, ya que cuando la presión osmótica se mantiene por medio de la adición de NaCl o sorbitol se observa la misma desestabilización de Trk1 que se produce en medio mínimo sin suplemento de potasio. Es interesante comentar que se observó una actividad muy baja de Trk1 (medida como toma de rubidio) cuando las células se crecían en presencia de altas concentraciones externas de potasio (Figura 4.18), lo que sugiere que el transportador no está activo en estas condiciones.

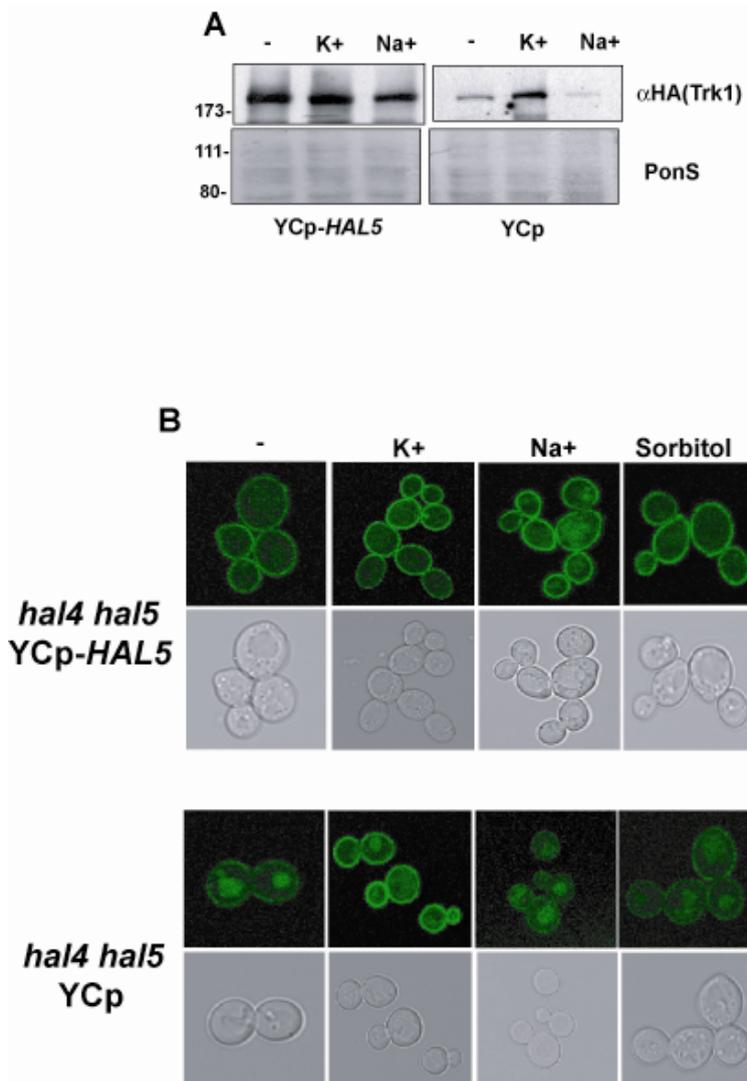


FIG. 4.19. La acumulación en la vacuola de Trk1 no es debida a los cambios en la presión osmótica producidos durante el ayuno de potasio. (A) Análisis *Western* de las proteínas insolubles aisladas de la cepa mutante *hal4hal5* transformada con un plásmido vacío o con un plásmido centromérico con una copia del gen *HAL5* incubadas durante 2 horas en medio mínimo sin ningún suplemento (-) o medio mínimo suplementado con 0,2 M KCl (K⁺) o 0,2 M NaCl (Na⁺). La cantidad de Trk1 se analizó utilizando el anticuerpo anti-HA (panel superior), y la cantidad de proteína presente en cada muestra se muestra en la membrana teñida con PonceauS (PonS) en el panel inferior. (B) Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de la localización de la fusión Trk1-GFP en el mutante *hal4hal5* bajo las mismas condiciones experimentales, incluyendo además un control adicional con células crecidas en medio suplementado con una concentración osmóticamente equivalente de sorbitol (0,3 M).

3. Efecto de la sobreexpresión de *HAL5* sobre la estabilidad de Trk1 en la membrana plasmática.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de *HAL5* en la expresión del gen *TRK1* y en la estabilidad y localización del transportador Trk1 se ha utilizado el mutante *hal4hal5* transformado con un plásmido vacío, con un plásmido centromérico que contiene la pauta de lectura abierta de *HAL5* bajo el control de su propio promotor como se ha descrito con anterioridad, o con un plásmido episómico que contiene el mismo fragmento genómico de *HAL5*. Se compararon los niveles de RNA mensajero del gen *TRK1* y de proteína Trk1 en cepas crecidas en medio mínimo suplementado con potasio o incubadas durante 2,5 horas en medio sin suplemento de potasio. Los análisis *Northern* no muestran diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *TRK1* en ninguna de las condiciones experimentales probadas (Figura 4.20 - A). Al examinar los niveles de proteína Trk1 presentes en las mismas cepas, se observa que los niveles de Trk1 en la fracción insoluble son mayores a medida que aumentan los niveles de expresión de *HAL5* (Figura 4.20 – B y C). Estos resultados sugieren que a medida que aumentan los niveles de Hal5, hay más Trk1 presente en la membrana plasmática durante la incubación de las células en medio mínimo sin suplemento de potasio, y que esta regulación probablemente se debe a modificaciones post-traduccionales.

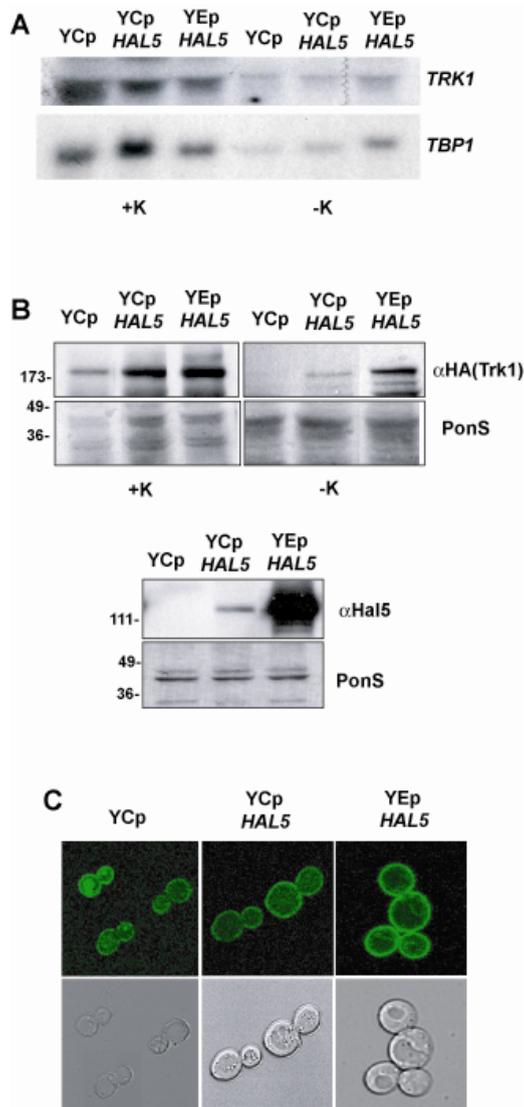


FIG. 4.20. La sobre-expresión de *HAL5* conduce a la acumulación de Trk1 en la membrana plasmática. (A) Se extrajo el RNA total de las cepas indicadas crecidas en medio suplementado con potasio (+K) o incubadas durante 2,5 horas en medio mínimo sin suplemento de potasio (-K). Se realizaron análisis *Northern* para determinar los niveles de RNAm de *TRK1* utilizando una sonda correspondiente a los nucleótidos desde el 385 al 2319 (panel superior). La membrana se rehibridó con una sonda contra *TBP1* como control de carga (panel inferior). (B) Análisis *Western* de las proteínas de la fracción insoluble aislada de las mismas cepas y tratada como se ha descrito en el panel A. Se muestran las cantidades de Trk1 marcado con HA (panel superior) y Hal5 (panel inferior). La membrana teñida con Ponceau (PonS) se muestra como control de carga de proteína para cada caso. (C) Imágenes obtenidas por microscopia confocal de la localización de la fusión Trk1-GFP en la cepa mutante *hal4hal5* transformada con un plásmido vacío o un plásmido centromérico (YCp) o multicopia (YEp) con la secuencia codificante del gen *HAL5* bajo el control de su propio promotor.

4. Efecto de la doble mutación *hal4hal5* sobre otros transportadores de la membrana plasmática.

Para probar la especificidad de los efectos observados sobre la estabilidad de Trk1 en las cepas mutantes *hal4hal5* incubadas en medio sin suplemento de potasio, se estudió la localización de otras proteínas transportadoras fusionadas a GFP en las mismas condiciones. Como puede verse en la figura 4.21, la localización de tres proteínas transportadoras de nutrientes, la permeasa de arginina Can1, la permeasa de uracilo Fur4 y el transportador de glucosa de baja afinidad Hxt1, también es defectiva. Las tres proteínas se encuentran presentes en la membrana plasmática en la cepa silvestre, independientemente de la concentración de potasio del medio, como era de esperar (panel superior). Sin embargo, en el mutante *hal4hal5*, se puede observar una marcada acumulación vacuolar de estas permeasas después de una incubación en medio sin suplemento de potasio (panel central). Se obtuvieron resultados similares también para la permeasa de triptófano Tat2 (datos no mostrados). Además, en el caso de Fur4 y Hxt1, esta deslocalización se puede observar incluso en células que se han mantenido en un medio suplementado con potasio, lo que sugiere un papel de Hal4 y Hal5 en el tráfico de transportadores de la membrana plasmática independiente de los niveles intracelulares de potasio.

Estos efectos sobre la localización de los transportadores de la membrana plasmática en el mutante *hal4hal5* pueden ser atribuidos específicamente a estas quinasas, o a la baja concentración intracelular de potasio causada por la falta de actividad de Trk1. Para comprobarlo, se examinaron los patrones de fluorescencia de GFP de estos transportadores en el mutante *trk1trk2* en presencia y ausencia de suplemento de potasio en el medio. Se obtuvieron patrones similares, pero no idénticos, a los obtenidos en el mutante *hal4hal5* (panel inferior). Se puede ver que, después del ayuno de potasio, Can1, Fur4 y Hxt1 (en menor medida), parecen ser menos estables, ya que se acumula más GFP en la vacuola en el mutante *trk1trk2*. Sin embargo, en presencia de potasio, la deslocalización de Fur4 y especialmente la de Hxt1, es menos aparente en comparación con lo que se había observado para el mutante *hal4hal5*.

Para confirmar estos resultados de una forma cuantitativa, se analizó la cantidad de Fur4-GFP en las mismas cepas y bajo las mismas condiciones experimentales. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante microscopia, se observó menos Fur4 en el mutante *hal4hal5*, incluso al suplementar el medio con potasio, que en la cepa silvestre, y estos niveles caían aún más drásticamente después del ayuno de potasio (Figura 4.22). Los niveles de proteína Fur4 del mutante *trk1trk2* son comparables a los de la cepa silvestre cuando crecemos las células en un medio suplementado con potasio. Después del ayuno de potasio se observó un descenso en los niveles de proteína Fur4 en el mutante *trk1trk2*, pero este efecto no parece tan dramático como en el mutante *hal4hal5*. Estos resultados sugieren que en el caso de Fur4 tanto las quinasas Hal4 y Hal5 como las concentraciones intracelulares de potasio son importantes para la estabilidad del transportador en la membrana plasmática.

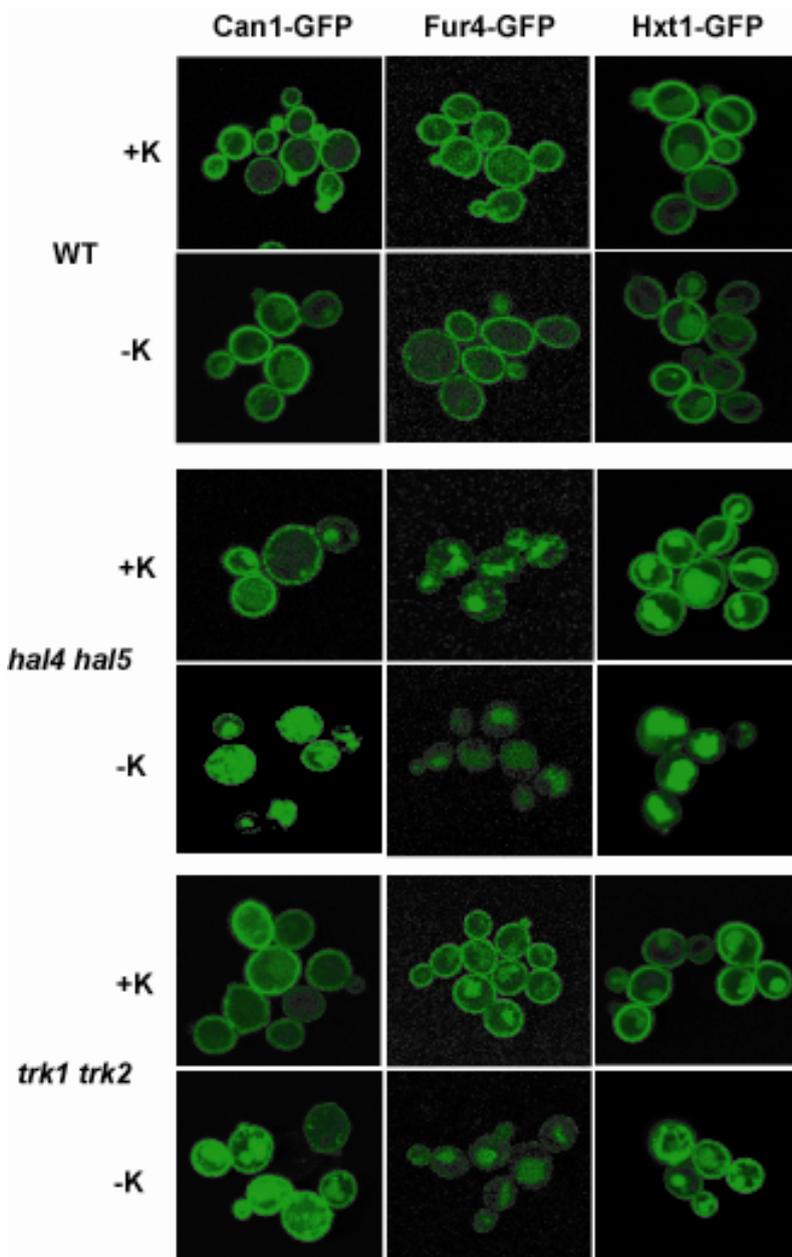


FIG. 4.21. Localización subcelular de los transportadores / permeasas de nutrientes en las cepas silvestre, *hal4hal5* y *trk1trk2*. Las cepas indicadas fueron transformadas con plásmidos que expresan fusiones de GFP con las proteínas Can1, Fur4 y Hxt1, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo 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.

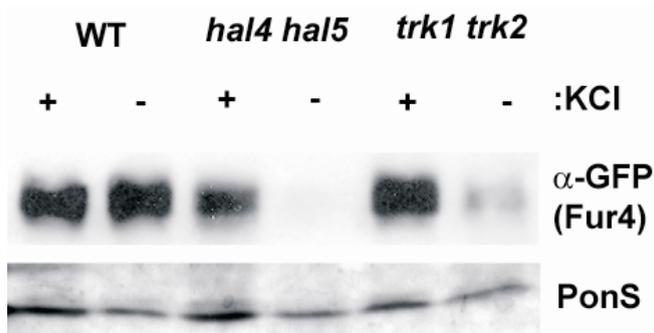


Fig. 4.22. Análisis *Western* de la proteína Fur4 en la fracción insoluble. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron de las cepas indicadas expresando un plásmido con la fusión Fur4-GFP y tratadas como se ha descrito en la figura 4.21. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Fur4-GFP, y se ha mostrado la tinción de la membrana con Ponceau (PonS) como control de carga de proteína.

Adicionalmente se estudió la distribución de otras dos proteínas de la membrana plasmática. En primer lugar se examinó la localización de una fusión Gap1-GFP. Se sabe que el tráfico de esta permeasa de aminoácidos está regulado por el tipo de fuente de nitrógeno disponible y por la proteína quinasa Npr1 (De Craene et al., 2001; Nikko et al., 2003). En estudios previos se ha demostrado que Gap1 se localiza en la membrana plasmática cuando las células crecen en fuentes de nitrógeno pobres, como la prolina o la urea, por lo que el siguiente paso fue analizar la localización de la fusión Gap1-GFP en una cepa silvestre y en los mutantes *hal4hal5* y *trk1trk2* después de crecer las células en un medio con prolina como fuente de nitrógeno y suplementado con potasio. Como se puede ver en la figura 4.23 - A, en estas condiciones se observa algo de GFP en la vacuola en todas las cepas; sin embargo, se puede observar una cantidad considerable de fusión Gap1-GFP en la membrana plasmática tanto en la cepa silvestre como en el mutante *trk1trk2*. Por el contrario, se observa menos acumulación de Gap1-GFP en la membrana plasmática en el mutante *hal4hal5*. Se obtuvieron resultados similares utilizando un medio con urea como fuente de nitrógeno (datos no mostrados).

Como se había observado un defecto más general de lo esperado en la estabilidad en la membrana plasmática de varios transportadores y permeasas en el mutante *hal4hal5*, se decidió analizar un tipo diferente de proteínas de la membrana plasmática. Se eligió Sur7, una proteína estructural de la membrana plasmática, que está localizada en zonas de la membrana asociadas con sitios de endocitosis llamadas eisomas (Walther et al., 2006). Se observó el patrón de fluorescencia de fusión Sur7-GFP en el mutante *hal4hal5* en un medio con y sin suplemento de potasio. Como se puede ver en la figura 4.23 - B, Sur7 es estable en la membrana plasmática en el mutante *hal4hal5* después de 2 horas de incubación en medio sin suplemento de potasio. Se han obtenido patrones de localización idénticos en cepas silvestres (datos no mostrados).

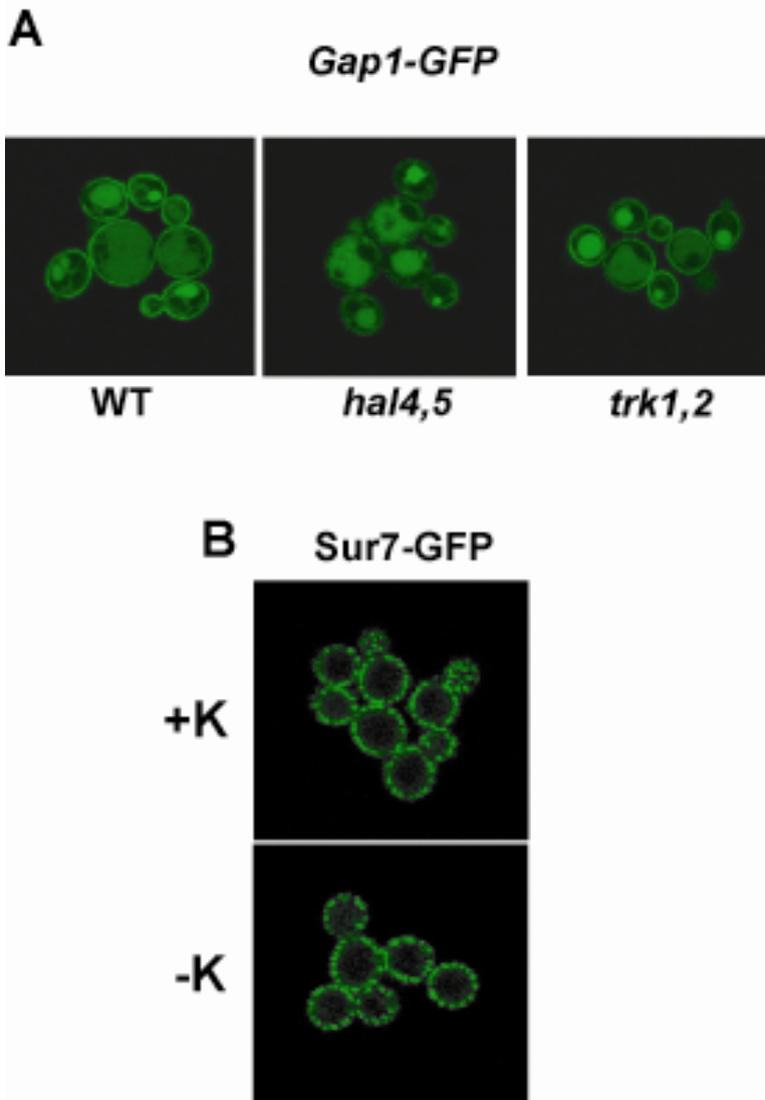


FIG. 4.23. Localización subcelular de la permeasa Gap1 y de la proteína estructural de la membrana plasmática Sur7. (A). La localización subcelular de la fusión Gap1-GFP se analizó en las cepas indicadas crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio (50 mM) y con prolina como única fuente de nitrógeno. Se muestran las microfotografías más representativas. (B) La localización subcelular de la proteína estructural de la membrana plasmática Sur7 en el mutante *hal4hal5* se analizó por microscopía confocal después de 2 horas de incubación en medio mínimo (sin suplemento de KCl). Se encontraron patrones de distribución de Sur7 idénticos en la cepa silvestre y en el mutante *hal4hal5* crecido en medio suplementado con potasio (datos no mostrados).

En base a resultados previos que demuestran que la ubiquitina-ligasa Rsp5 participa en el tráfico y en la estabilidad de muchos transportadores en levadura, incluyendo Fur4, Can1, Tat2 y Gap1 (Rotin et al., 2000), se decidió estudiar si la estabilidad de Trk1 está sujeta a mecanismos de regulación semejantes. Se analizó la estabilidad de Trk1 en cepas mutantes *hal4hal5* con una expresión reducida de Rsp5, construyendo una cepa con una disrupción parcial del promotor del gen *RSP5* y midiendo los niveles de proteína Trk1 en la membrana plasmática después de 30 y 60 minutos de ayuno de potasio (Figura 4.24 - A). Como se puede ver, después del ayuno de potasio, los niveles de Trk1 decrecen de forma significativa en el mutante *hal4hal5*. En el mutante *hal4hal5* con expresión reducida del gen *RSP5* se observa una menor acumulación de Trk1 en la membrana plasmática en células crecidas en medio suplementado con potasio, y estos niveles caen ligeramente durante el ayuno de potasio. Para determinar si la mayor estabilidad de los transportadores de nutrientes de la membrana plasmática debida a la expresión reducida de Rsp5 afectaba a los fenotipos de crecimiento del mutante *hal4hal5* se realizaron unos ensayos de crecimiento en medio sólido. Como se puede ver en la figura 4.24 -B, la cepa *hal4hal5npi1* presenta un menor crecimiento en todas las condiciones probadas, lo que sugiere que la reducción de los niveles de expresión de Rsp5 no es capaz de mejorar los defectos de crecimiento del mutante *hal4hal5*. Esta menor tasa de crecimiento fue más evidente en medio mínimo sin suplemento de potasio, lo que está de acuerdo con los menores niveles de Trk1 observados en esta cepa. Sin embargo, el mutante *npi1* tiene fenotipos pleiotrópicos, lo que complica la interpretación de estos resultados.

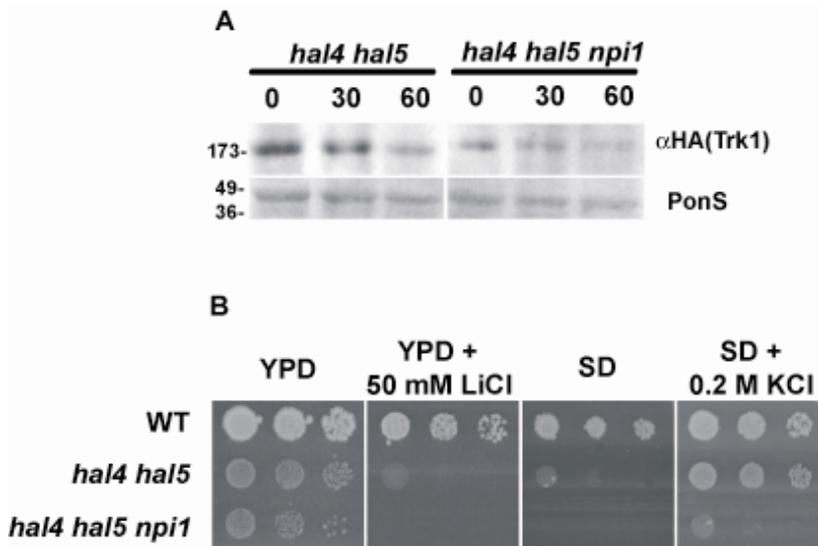


FIG. 4.24. Una reducción en la expresión de Rsp5 conduce a un descenso de la cantidad de Trk1 en el mutante *hal4hal5* y no corrige sus defectos de crecimiento. (A) Análisis *Western* de los niveles de Trk1 en las fracciones insolubles de las cepas indicadas. La cantidad de Trk1 se detectó utilizando anticuerpos anti-HA, y se muestra la membrana teñida con PonceauS (PonS) como control de carga de proteína. Se indica el tiempo transcurrido de incubación en medio sin suplemento de potasio (0, 30 y 60 minutos). (B) Las cepas indicadas se crecieron hasta saturación en medio mínimo selectivo suplementado con potasio, diluidas en serie y depositadas en placas con los medios indicados en estado sólido. Se comprobó el crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28 °C.

5. Análisis de la estabilidad de la versión truncada de Trk1 en el mutante *hal4hal5*.

Como se ha visto en el capítulo anterior, la versión truncada de Trk1, y no la proteína completa, es capaz de complementar la sensibilidad a sal y pH bajo del mutante *hal4hal5*, de conferir tolerancia a concentraciones tóxicas de LiCl en medio YPD, de mejorar el crecimiento del mutante *hal4hal5* en medio mínimo sin suplemento de potasio, y de corregir los defectos de toma de rubidio de este mutante.

Postulamos que el fenotipo de rescate observado en células transformadas con la versión truncada *TRK1 Δ 35* puede ser debido a una mayor estabilidad en la membrana

plasmática de esta proteína. Por ello, se analizó la estabilidad de esta proteína truncada en el mutante *hal4hal5* durante el ayuno de potasio. Como puede verse en el análisis *Western* mostrado en la figura 4.25, la versión truncada es mucho más estable que la versión silvestre de Trk1 en el mutante *hal4hal5*. También se determinó la estabilidad de la ATPasa de protones Pma1 en estas condiciones, y se observó que no se producían cambios significativos en los niveles de esta proteína.

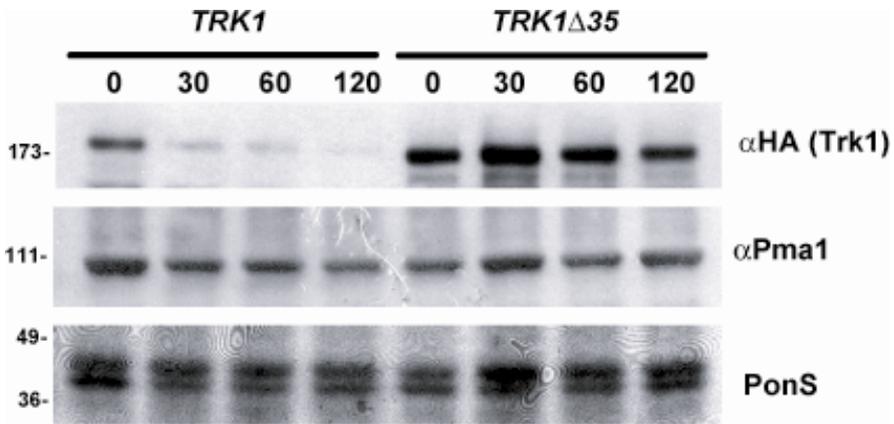


FIG. 4.25. Análisis *Western* de las versiones silvestre y truncada de la proteína Trk1. La cepa mutante *hal4hal5* se transformó con un plásmido centromérico que contenía la versión completa de Trk1 o la versión truncada a la que le faltan los últimos 35 aminoácidos (Trk1 Δ 35). Las cepas se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio, y luego fueron transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio. Se recogieron las muestras en los tiempos indicados, y se analizaron las cantidades de Trk1 (panel superior) y Pma1 (panel central) por análisis *Western*. La membrana teñida con PonceauS se muestra como control de carga de proteínas (PonS).

6. Análisis de la estabilidad de otros transportadores de la membrana plasmática en células que expresan la versión truncada de Trk1.

Puesto que la versión truncada de Trk1 parece activa en el mutante *hal4hal5*, puede ser utilizada como un sistema experimental para empezar a distinguir entre las contribuciones del potasio y de las quinasas Hal4 y Hal5 en la estabilidad de los transportadores de nutrientes. El siguiente paso fue el análisis de la localización de los

transportadores Can1, Hxt1 y Fur4 en mutantes *hal4hal5* que expresan la versión silvestre de *TRK1* o la versión truncada, y por tanto, más estable (Trk1 Δ 35) por análisis *Western* (Figura 4.26 - A). En estos experimentos se observó un defecto similar en la localización o estabilidad de estos transportadores después de quitar el suplemento de potasio del medio en cepas expresando la versión truncada Trk1 Δ 35 y cepas que expresan la versión silvestre Trk1. Este resultado sugiere que Hal4 y Hal5 pueden estar influenciando la localización y/o estabilidad de los transportadores independientemente de Trk1. En los casos de Fur4 y Can1 se observó un marcado descenso en la cantidad de proteína presente en la membrana plasmática después de 2 horas de incubación en medio mínimo sin suplemento de potasio. En el caso de Hxt1, la cantidad de proteína presente en la membrana plasmática disminuye, mientras que los productos aparentes de degradación de esta proteína aumentan sus niveles. Para confirmar esta interpretación se analizó la cantidad de GFP libre presente en la fracción soluble. Como era de esperar, la cantidad de proteína Hxt1-GFP disminuye en la fracción insoluble y la cantidad de GFP libre aumenta en la fracción soluble, lo que podría corresponder a la señal que se había observado en el interior de la vacuola en los experimentos de microscopia (Figura 4.26 – B).

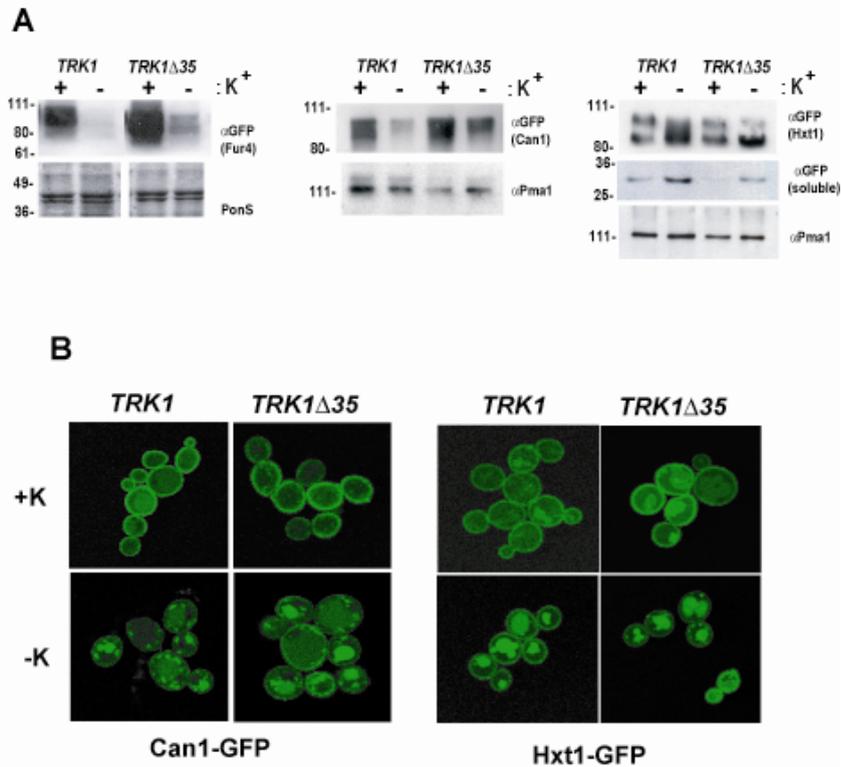


FIG. 4.26. Localización subcelular de los transportadores / permeasas de nutrientes en el mutante *hal4hal5* expresando las versiones silvestre y truncada de *TRK1*. (A) Las cepas mutantes *hal4hal5* (fondo genético W303) que expresan las fusiones de proteínas de las versiones de *Trk1* que se indican fueron crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio y luego se incubaron en medio suplementado con potasio o medio sin suplemento de potasio durante 2 horas. Las muestras se procesaron para el análisis *Western* como se ha descrito en Materiales y Métodos y se analizó la cantidad de Fur4-GFP (panel izquierdo), Can1-GFP (panel central) o Hxt1-GFP (panel derecho). En el caso de Hxt1, la aparición de GFP libre en la fracción soluble también fue analizada [GFP (soluble)]. Se muestran las membranas teñidas con PonceauS (PonS) o la cantidad de Pma1 como control de carga de proteína. (B) Las cepas mutantes *hal4hal5* que expresan las proteínas indicadas se crecieron como se describe para el panel A, y se generaron imágenes microscópicas. Se han mostrado las microfotografías más representativas.

Para investigar la posibilidad de que el mutante *hal4hal5* mostrara una toma reducida de otros nutrientes además del potasio, se ensayó el crecimiento de la cepa *hal4hal5* en medio mínimo suplementado con 0,1 M KCl y con un exceso (300 $\mu\text{g/ml}$) o cantidades limitantes (1,2 $\mu\text{g/ml}$) de uracilo. Como se puede observar en la figura 4.27 - A, únicamente el mutante *hal4hal5* no es capaz de crecer con cantidades limitantes de uracilo,

lo que sugiere que la toma de uracilo de alta afinidad es defectiva en este mutante. Estos resultados coinciden con los obtenidos por microscopía confocal, donde se había visto una localización defectiva del transportador Fur4 en el mutante *hal4hal5* pero no en el mutante *trk1trk2*, incluso en medio suplementado con potasio. Además se ha observado que la expresión de la versión truncada de Trk1 no mejora el crecimiento en estas condiciones, como era de esperar de acuerdo con los análisis *Western* de la estabilidad de Fur4 (Figura 4.22).

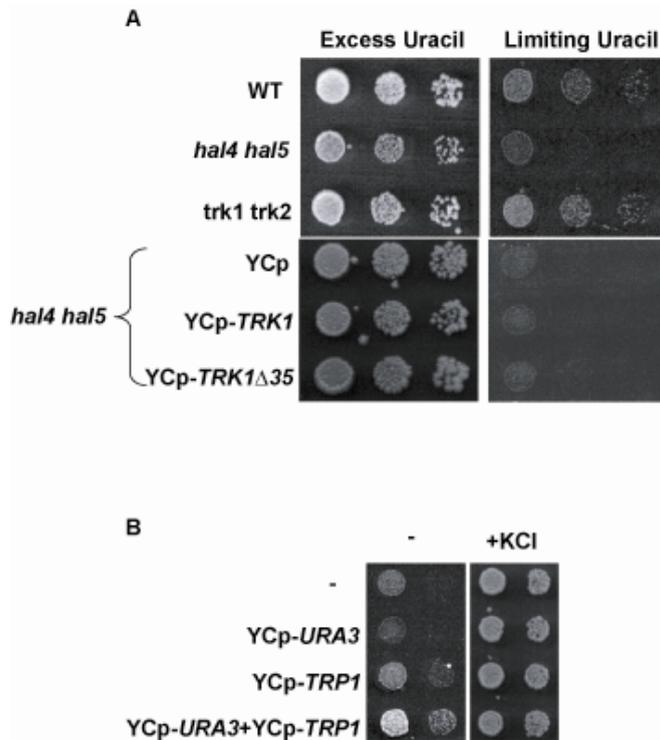


FIG. 4.27. Requisitos para el crecimiento del mutante *hal4hal5*. (A) Las cepas indicadas se crecieron hasta saturación en medio mínimo suplementado con potasio, se diluyeron en serie y se depositaron en placas de medio mínimo suplementadas con 0,1 M KCl y 300 μ g/ml (exceso) o 1,2 μ g/ml (limitante) de uracilo. Se midió el crecimiento después de 48-72 horas. WT indica la cepa silvestre. (B). La cepa *hal4hal5* se transformó con los plásmidos indicados, se creció hasta saturación en medio mínimo suplementado con potasio, y unas diluciones seriadas se depositaron en placas de medio mínimo con uracilo, triptófano y adenina (para complementar las auxotrofías de las cepas no transformadas o transformadas sólo con uno de los plásmidos) y sin (-) o con (+KCl) 0,1 M KCl. Se midió el crecimiento después de 72-96 horas de incubación a 28 °C.

Estos resultados, que sugieren que los defectos en la toma de nutrientes pueden contribuir al fenotipo de crecimiento lento del mutante *hal4hal5*, se han corroborado complementando las rutas de biosíntesis de uracilo y triptófano con plásmidos centroméricos. Si estos transportadores de nutrientes son menos estables en el mutante *hal4hal5*, como se ha visto por microscopía, la complementación de las rutas biosintéticas debe mejorar el crecimiento de este mutante en medio mínimo sin suplemento de potasio. Como se puede ver en la figura 4.27 - B, después de 5 días de crecimiento se produjo una ligera mejora del crecimiento del mutante *hal4hal5* transformado con los plásmidos que complementan las rutas biosintéticas de uracilo y triptófano en comparación con las cepas control, que solo llevaban uno o no llevaban ninguno de los dos plásmidos. Es importante resaltar que estos experimentos se llevaron a cabo con presencia en el medio de uracilo y triptófano, lo que sugiere que el mutante *hal4hal5* es defectivo en la toma de uracilo y triptófano del medio externo.

V. DISCUSIÓN

Discusión de los resultados obtenidos

Hay distintas evidencias previas que sugieren que las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 son efectores positivos necesarios para el funcionamiento normal del sistema de transporte de potasio TRK. Se ha observado que el mutante *hal4hal5* no crece en medio con niveles bajos de potasio, y que tiene niveles más bajos de toma de rubidio 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).

Como se ha descrito en apartados anteriores, se ha tratado de estudiar la interacción directa entre las proteínas 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 este abordaje se pretende caracterizar el modo de interacción entre el sistema TRK y Hal4 y Hal5.

En primer lugar se ha realizado un estudio de los niveles intracelulares de potasio del mutante *hal4hal5*. Las medidas de las concentraciones intracelulares de potasio, han demostrado que, en medio rico, la concentración intracelular de potasio es menor en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre (165 ± 23 mM vs. 249 ± 29 mM), como era de esperar de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de toma de rubidio (análogo del potasio) que se han descrito para este mutante. En medio mínimo suplementado con 0.2 M KCl, las concentraciones intracelulares de potasio son prácticamente idénticas en ambas cepas (162 ± 18 mM vs. 161 ± 11 mM). Probablemente este resultado se debe a que, con concentraciones tan altas de potasio en el medio, la toma a través del sistema TRK no es tan importante, y la mayor parte del transporte de potasio se está produciendo a través de sistemas de baja afinidad. Después de 2 horas de incubación

en medio sin suplemento de potasio, en la cepa silvestre la concentración intracelular de potasio solo sufre un ligero descenso (136 ± 7 mM vs. 161 ± 11 mM), mientras que en el mutante *hal4hal5* cae de forma considerable (92 ± 8 mM vs. 162 ± 18 mM), poniendo de nuevo de manifiesto el problema que tiene este mutante con la toma de potasio de alta afinidad.

En los ensayos de crecimiento en medio líquido se ha observado que, aunque el hecho de suplementar el medio con potasio mejora el crecimiento del mutante *hal4hal5* en todas las condiciones estudiadas, no es suficiente para igualar los niveles de crecimiento del mutante a los de la cepa silvestre, lo que nos sugiere que el mutante *hal4hal5* tiene otros problemas adicionales aparte de los derivados de la falta de potasio.

Se ha descrito que el mutante *hal4hal5* sufre una hiperpolarización de la membrana plasmática que le hace más sensible a cationes tóxicos (Mulet et al., 1999). Probablemente esta menor concentración intracelular de potasio sea la causa de la hiperpolarización de la membrana plasmática del mutante *hal4hal5*.

Además de los efectos descritos sobre el potencial de membrana, las alteraciones en el transporte de potasio pueden afectar al pH intracelular debido a la necesidad de mantener la neutralidad eléctrica en las células. En el mutante *ppz1ppz2* se han encontrado evidencias de esta correlación entre concentración intracelular de potasio y pH citosólico. En este mutante, donde la concentración interna de potasio es más alta que la de la cepa silvestre, se ha observado una alcalinización del citosol, presumiblemente causada por el menor acumulo de protones requerido para mantener la neutralidad eléctrica (Yenush et al., 2002). En el mutante *hal4hal5*, sin embargo, esta correlación entre concentración intracelular de potasio y pH no es tan evidente. Sorprendentemente, en medio mínimo suplementado con potasio, donde la concentración intracelular de potasio del mutante *hal4hal5* es muy similar a la de la cepa silvestre, el pH citosólico del mutante es en torno a 0.3 unidades más bajo que en la cepa silvestre. Esta acidificación es aproximadamente la misma que se observa después de 2 horas de incubación en medio sin suplemento de potasio, donde las diferencias en la concentración intracelular de potasio entre ambas cepas sí son importantes.

Además, también se midió el pH citosólico en células del mutante *hal4hal5* expresando la versión truncada de *TRK1*, *TRK1Δ35*, que es más estable en la membrana plasmática, y mejora los niveles de toma de rubidio hasta casi igualarlos con los de la cepa silvestre. Se ha comprobado que no existen diferencias significativas entre el pH interno de células del mutante *hal4hal5* que expresan esta versión truncada de *TRK1*, y células que expresan la versión silvestre de *TRK1*. Todos estos resultados sugieren que los bajos niveles intracelulares de potasio no son la única causa de la acidificación interna que se ha observado en el mutante *hal4hal5*.

En las células de levadura, se ha descrito que la toma de aminoácidos depende del gradiente de protones (Vallejo y Serrano, 1989). De acuerdo con este planteamiento, el mutante *hal4hal5*, que tiene un pH interno más bajo que el silvestre, debería tener más dificultad para tomar aminoácidos del medio. Se ha observado que el mutante *hal4hal5* presenta un defecto en la toma de leucina y metionina. También se ha visto que el mutante presenta una mejoría en su crecimiento al complementar las rutas biosintéticas de uracilo y triptófano, lo que sugiere un defecto general en la toma de nutrientes.

Esta observación está apoyada por la mayor activación de la ruta GCN (*General Control of Nutrients*) que se ha observado en este mutante. Se han publicado varios trabajos que relacionan la actividad de esta ruta con la homeostasis de iones. Se ha descrito que el estrés por altas concentraciones de sodio (1.25 M), pero no el estrés por altas concentraciones de potasio (1.25 M) produce un aumento en la actividad de la ruta GCN, a pesar de que en ambos casos se observó una reducción en la toma de aminoácidos (Goossens et al., 2001). En otro estudio se ha descrito que no sólo un exceso de sodio en el medio es capaz de activar la ruta GCN, sino que un ayuno de potasio tiene los mismos efectos (Narasimhan et al., 2004). Uno de los efectos del estrés por sodio es la disminución de la concentración intracelular de potasio, por lo que parece, que en todas estas condiciones, el ayuno de potasio podría ser el responsable de la activación de la ruta GCN. Este planteamiento está de acuerdo con las observaciones que se han realizado en el mutante *hal4hal5*, en el que los bajos niveles intracelulares de potasio coinciden con una

mayor activación de la ruta GCN, aunque se desconoce la relevancia fisiológica que este hecho pueda tener.

La menor concentración intracelular de potasio del mutante *hal4hal5*, aunque probablemente contribuye a la activación de la ruta GCN, parece no ser la única causa. En el mutante *trk1trk2*, donde no hay toma de potasio mediada por el sistema TRK, los niveles de activación de esta ruta son significativamente menores que en el mutante *hal4hal5*, lo que sugiere que debe haber otros factores, independientes del defecto en la toma de potasio, que también contribuyan a la activación de la ruta GCN en el mutante *hal4hal5*.

Como abordaje adicional para el estudio de los distintos fenotipos del mutante *hal4hal5* se ha llevado a cabo un análisis en profundidad de su transcriptoma. Se han comparado los perfiles de transcripción de la cepa silvestre y del mutante *hal4hal5* en dos fondos genéticos distintos, el W303 y el BY4741.

En todos los experimentos realizados se ha observado que en el mutante *hal4hal5* se produce un mayor acúmulo de mensajeros de genes relacionados con el metabolismo energético y con la biosíntesis de metionina que en la cepa silvestre. En este trabajo se ha comprobado que el mutante *hal4hal5* 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 *hal4hal5* 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 más mensajeros de genes relacionados con estas categorías funcionales en el mutante *hal4hal5* podría estar reflejando alguna alteración en los niveles de metabolismo aeróbico y/o en la morfología de las mitocondrias en este mutante. Se ha observado que no hay diferencias a nivel

morfológico entre las mitocondrias de la cepa silvestre y el mutante *hal4hal5*. Sin embargo, 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 un desplazamiento del metabolismo energético hacia la respiración.

Por otra parte, hay dos grupos de genes que se acumulan en mayor proporción en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre, pero sólo en uno de los dos fondos genéticos estudiados, el W303. En este fondo genético, en el mutante *hal4hal5* también se acumulan más 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 *hal4hal5*. 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. La otra categoría funcional que aparece sobre-representada entre los mensajeros que se acumulan en el mutante *hal4hal5* en el fondo genético W303 es la de respuesta a estrés. Como se ha descrito anteriormente, el mutante *hal4hal5*, en las condiciones en que se ha llevado a cabo el análisis transcriptómico, tiene una concentración intracelular de potasio considerablemente más baja que la de la cepa silvestre, lo que probablemente le esté causando estrés osmótico. Para confirmar esta hipótesis se realizaron análisis *Western* que reflejaron niveles más altos de fosforilación de la proteína Hog1 en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre (datos no mostrados). Probablemente, el estrés osmótico del mutante *hal4hal5* es percibido por osmosensores en la membrana plasmática, que activan la ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*). La activación de esta ruta finalmente conduce a aumentar los niveles de transcripción de genes relacionados con la respuesta a estrés a través de los factores de transcripción Msn2 y Msn4. El hecho de que este tipo de respuesta a estrés solo haya aparecido en el fondo genético W303 y no en el BY4741 probablemente sea debido a que el fondo genético W303 es mucho más sensible a cualquier tipo de estrés que el BY4741.

El análisis transcriptómico también ha revelado que en el mutante *hal4hal5* 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 *hal4hal5* relacionados con el metabolismo de aminoácidos son genes catabólicos, como *CHA1*, *ASP1*, *ARO9* y *ARO10*, *GCV2* y *GCV3*, o *CDC60*. 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 *hal4hal5* 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.

A lo largo de la segunda parte de este trabajo se ha descrito el papel que desempeñan las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de la estabilidad de distintos transportadores de la membrana plasmática. El transportador de potasio de alta afinidad Trk1 se degrada rápidamente en la cepa mutante *hal4hal5* después de quitar el suplemento de potasio añadido al medio de crecimiento. Por el contrario, la sobre-expresión del gen *HAL5* produce una mayor acumulación de la proteína Trk1 en la membrana plasmática. Estos resultados explican tanto la dependencia de potasio observada en el mutante *hal4hal5* como el mecanismo por medio del cual la sobre-expresión de *HAL5* produce tolerancia a salinidad.

Se ha visto también que a pesar de que el mutante *hal4hal5* 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 presentan deslocalizaciones similares a las observadas para Trk1.

Todos estos datos sugieren que las quinasas Hal4 y Hal5 podrían estar desempeñando una función análoga a la que se ha propuesto para otra quinasa de la misma familia, Npr1 (De Craene et al., 2001). Sin embargo, las condiciones fisiológicas en las cuales son importantes estas quinasas parecen ser diferentes. Las quinasas Hal4 y Hal5 son necesarias para el crecimiento en medio con amonio como fuente de nitrógeno y concentraciones fisiológicas de potasio, mientras que la actividad de la quinasa Npr1 es importante durante el ayuno de nitrógeno. Muchas otras proteínas de la membrana plasmática son dirigidas hacia la vacuola para su degradación por un mecanismo dependiente de ubiquitinación. En todos estos casos están implicados el ayuno de nitrógeno, el tratamiento con rapamicina o la regulación negativa mediada por sustratos (Horak, 2003). En este trabajo presentamos pruebas de que las quinasas Hal4 y Hal5 están implicadas en la modulación del tráfico de varias proteínas transportadoras de la membrana plasmática en condiciones estándar de crecimiento.

Hay evidencias genéticas que sugieren una compleja regulación del transportador de potasio Trk1. Trabajos de distintos grupos han identificado proteínas quinasas, como Hal4, Hal5 y Sky1 (Mulet et al., 1999) (Forment et al., 2002), proteínas fosfatasas, como Ppz1, Ppz2 y calcineurina (Yenush et al., 2005) (Mendoza et al., 1994), proteínas G, como Arl1 (Munson et al., 2004), proteínas transportadoras de iones, como Nha1 (Banuelos et al., 2002), y proteínas de función desconocida, como Hal1 (Rios et al., 1997), que participan en la regulación del transporte de potasio a través de Trk1. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el mecanismo de regulación es desconocido.

Se ha descrito anteriormente que la inactivación de los dos genes que codifican las proteínas fosfatasas Ppz1 y Ppz2 aumenta los niveles de fosforilación de Trk1 y produce una acumulación de potasio en las células. Sin embargo, la estabilidad y/o la localización subcelular de la proteína Trk1 no se ve afectada en la cepa mutante *ppz1ppz2* (Yenush et al., 2005).

De forma parecida, no se observan efectos importantes en los niveles o en la localización subcelular de la fusión Trk1-GFP en cepas mutantes para los genes *SKY1*, *CNB1*, *ARL1*, *NHA1*, *HAL1*, *HOG1*, *BUL1* o *BUL2* (datos no mostrados). Se probó el efecto de la mutación de *HOG1* en base a trabajos previos que relacionan este gen con la regulación de transportadores de iones, como Nha1 y Tok1, en condiciones de estrés osmótico (Proft y Struhl, 2004). Los genes *BUL1* y *BUL2* codifican proteínas que forman parte del complejo Rsp5 E3-ubiquitin ligasa, y que se ha propuesto que actúan como enzimas E4, importantes para la multi-ubiquitinación de sustratos específicos (Hoppe, 2005).

La ubiquitinación mediada por Rsp5 se ha descrito como un paso clave en la regulación del tráfico intracelular de muchas proteínas de la membrana plasmática, como la permeasa de aminoácidos Gap1 (Soetens et al., 2001). Nuestros resultados indican que la llegada y/o la estabilidad del transportador de potasio Trk1 en la membrana plasmática parece estar regulada por Rsp5, aunque en la dirección opuesta a la observada en el caso de Gap1. La cantidad de Trk1 presente en la membrana plasmática en cepas mutantes *hal4hal5* con niveles de expresión de *RSP5* reducidos (*hal4hal5npi1*) es considerablemente menor. Además, se ha observado que la reducción en los niveles de expresión de *RSP5*, que conduce a la estabilización de algunos transportadores de la membrana plasmática, no mejora los defectos de crecimiento observados en la cepa mutante *hal4hal5*. Sin embargo, debido al bajo nivel de crecimiento de esta cepa, no se puede descartar que estos efectos sean artefactos, y sería conveniente incluir nuevos experimentos, como por ejemplo estudios de la estabilidad de Gap1 en el triple mutante *hal4hal5npi1*, para definir mejor la relación existente entre Rsp5 y Trk1.

En este trabajo también se ha descrito que hay una serie de transportadores de la membrana plasmática, como Can1 (permeasa de arginina), Fur4 (permeasa de uracilo), Gap1 (permeasa de aminoácidos) y Hxt1 (permeasa de glucosa de baja afinidad), que también están deslocalizados en el mutante *hal4hal5* en medios con concentraciones bajas de potasio. El hecho de que en el mutante *hal4hal5* haya varios transportadores de nutrientes que no son estables en la membrana plasmática puede ser la causa que explique todos los fenotipos de ayuno observado, y que quizás no se pueden explicar sólo por las

bajas concentraciones intracelulares de potasio originadas por los bajos niveles de actividad del sistema TRK en este mutante.

La deslocalización de la permeasa de glucosa de baja afinidad Hxt1 podría ayudar a interpretar el aumento del metabolismo aeróbico que parece que está teniendo lugar en el mutante *hal4hal5*. Si este mutante tiene problemas en mantener los transportadores de glucosa estables en la membrana plasmática, posiblemente tendrá también una concentración intracelular de glucosa más baja. Al bajar las concentraciones de glucosa en el citosol, habrá una menor represión de determinados genes implicados en el metabolismo aeróbico (Tabla 4.11), lo que aumentaría los niveles de actividad respiratoria en el mutante. Se ha comprobado en el análisis transcriptómico, y se ha confirmado también mediante varios análisis *Northern*, que el mutante *hal4hal5* acumula mayor cantidad de mensajeros de genes relacionados con la respiración que la cepa silvestre. Estos resultados parecen confirmar la hipótesis de que se está produciendo una menor represión del metabolismo aeróbico en el mutante que en la cepa silvestre. Por otra parte, las medidas de actividad succinato-deshidrogenasa, muy superior en el mutante, también parecen confirmar esta hipótesis. Además se han realizado, en colaboración con Dolores Bernal, de la Universidad de Valencia, una serie de medidas, tanto de producción de CO₂ como de consumo de glucosa, durante el crecimiento en ambas cepas, y se ha comprobado que tanto la producción de CO₂ como el consumo de glucosa son menores en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre (Bernal, D., Yenush, L. y Pérez-Valle, J., datos no mostrados).

Todos los fenotipos que se han descrito para el mutante *hal4hal5* a lo largo de este trabajo parecen estar causados tanto por la mutación de las dos quinasas como por los bajos niveles intracelulares de potasio de este mutante. Como una primera aproximación para averiguar cuales de estos fenotipos dependen de los niveles de potasio, y cuales están causados directamente por la mutación de Hal4 y Hal5, se realizaron una serie de experimentos con una versión truncada de Trk1 que carece de los últimos 35 aminoácidos.

Los trabajos realizados con la versión truncada de *TRK1*, parecen indicar que los últimos 35 aminoácidos de esta proteína participan de alguna forma en su regulación. Los

últimos 35 aminoácidos de Trk1 contienen 10 sitios potenciales de fosforilación (S o T), y 5 residuos de lisina que pueden ser ubiquitinados para regular su llegada a la membrana plasmática o su degradación en la vacuola. Habría que llevar a cabo una mutagénesis en detalle de esta región para identificar los residuos concretos implicados en la regulación de Trk1.

Nuestro modelo para explicar los resultados observados sostiene que los últimos 35 aminoácidos contienen secuencias de regulación implicadas en el tráfico o el reciclaje del transportador, y que si son eliminadas, se produce una rotura del equilibrio a favor de su acumulación en la membrana plasmática. Este modelo sugiere que la regulación de la actividad del transportador tiene un papel menos importante, y que las quinasas Hal4 y Hal5, o los niveles altos de potasio, no son necesarios para la activación del transportador *per se*, sino para mantener los niveles de Trk1 en la membrana plasmática, posiblemente impidiendo modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación, que normalmente conduce a la degradación de la proteína en la vacuola. La estabilidad y la actividad de esta versión truncada del transportador Trk1 en el mutante *hal4hal5*, y la mejora en la estabilidad en la membrana plasmática de Trk1 con la sobre-expresión de *HAL5* apoyan este modelo.

Por otra parte, en este trabajo se ha descrito que la desestabilización de Trk1 y Can1 en la membrana plasmática en el mutante *hal4hal5* no se observa en medios suplementados con altas concentraciones de potasio, mientras que Fur4, Gap1, y en menor medida Hxt1, no se acumulan en la membrana plasmática del mutante *hal4hal5* ni aunque se suplemente el medio con potasio. Estos datos apuntan hacia la existencia de un nuevo tipo de regulación, de al menos un grupo de transportadores de nutrientes, en el que participan tanto las quinasas Hal4 y Hal5 como los niveles intracelulares de potasio. Sin embargo, hasta que se puedan esclarecer los detalles moleculares de esta regulación, no se puede descartar un efecto indirecto, relacionado con estrés en el caso de Fur4 por ejemplo.

El análisis que se ha llevado a cabo de la estabilidad y de la actividad de la versión truncada de Trk1 puede aportar información acerca de este nuevo mecanismo de regulación. Se ha observado que, a pesar de su mayor estabilidad y actividad de toma de potasio en

ausencia de Hal4 y Hal5, la expresión de esta versión truncada de Trk1 no es capaz de restaurar muchos de los defectos observados en el mutante *hal4hal5*, incluyendo la desestabilización de los transportadores de nutrientes Fur4, Can1 y Hxt1. Estos resultados sugieren que, además de participar en la regulación del transportador de potasio Trk1, las quinasas Hal4 y Hal5 pueden desempeñar un papel más general en la regulación de la estabilidad y/o el tráfico de otros transportadores de nutrientes.

Previamente se había observado que la fosforilación *in vivo* de Trk1 aumenta con la sobre-expresión de *HAL5* (Yenush et al., 2005). Sin embargo, todo parece indicar que probablemente este aumento se deba a un aumento en los niveles de proteína. No se ha podido detectar la fosforilación *in vitro* de Trk1 por Hal5, por lo que no es posible concluir si la regulación de Trk1 por Hal4 y Hal5 se produce de forma directa o indirecta.

Un trabajo reciente demuestra que la proteína quinasa Ptk2, relacionada con las quinasas Hal4 y Hal5 y presente en fracciones purificadas de la membrana plasmática, es capaz de fosforilar *in vitro* la Ser899 del extremo COOH-terminal de Pma1 expresada en una fusión con GST (Eraso et al., 2006). En el caso de la regulación mediada por Npr1 de la permeasa de aminoácidos de la membrana plasmática Gap1, o del factor de transcripción Gln3, no ha sido posible demostrar la fosforilación directa. Además, en ambos casos, Npr1 no es estrictamente necesaria para la fosforilación de los substratos (Crespo et al., 2004; De Craene et al., 2001).

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 Gap1 en la membrana. Se ha propuesto que Npr1 es un antagonista de la acción del complejo ubiquitin-ligasa Rsp5-Bul1/Bul2 E3/E4 en el caso de la translocación al núcleo de Gln3, pero no se conoce el mecanismo molecular por medio del cual sucede esto (Crespo et al., 2004). Se sabe que Gap1 está regulada por el mismo complejo, por lo que también en este caso Npr1 puede estar influenciando la actividad del complejo Rsp5-Bul1/Bul2. Otros dos transportadores de nutrientes que se han descrito en este trabajo como desestabilizados en el mutante *hal4hal5*, Fur4 y Can1, también pueden ser ubiquitinados de una forma dependiente de Rsp5, aunque

no se ha descrito que en estos casos participen también Bul1 y Bul2. Se ha observado un descenso en la cantidad de Trk1 presente en la membrana plasmática en el mutante *hal4hal5* con expresión reducida de *RSP5*, y que la cantidad de transportador presente en la membrana disminuye ligeramente durante el ayuno de potasio. Por tanto, parece que la ubiquitinación dependiente de Rsp5 puede estar también influenciando la estabilidad en la membrana plasmática de este transportador.

Se ha intentado encontrar alguna evidencia de interacción directa entre las quinasas Hal4 y Hal5 y el sistema de transporte de potasio Trk1, pero hasta el momento no se ha obtenido ningún resultado positivo. También se ha intentado demostrar la interacción entre Hal4 y Hal5 con la ubiquitin-ligasa Rsp5, pero tampoco en este caso se han obtenido resultados favorables.

Se intentó también encontrar interacciones entre Hal4 y Hal5 y otras proteínas mediante aproximaciones genéticas. Se ensayó la tolerancia a sal mediada por la sobre-expresión de *HAL4* o *HAL5* en varios mutantes. Nuestra hipótesis fue que, igual que se ha descrito en el caso del mutante *trk1trk2*, 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). Las proteínas Rvs161, Rvs167, Sac6, Lsp1, Inp52, Stt4 y Pil1 se seleccionaron como candidatos ya que se ha descrito que interaccionan físicamente con Hal4 (SGD project. "Saccharomyces Genome Database" <http://www.yeastgenome.org/>, 2008). La proteína Bre1 fue seleccionada como un posible candidato porque se ha descrito su interacción física con Hal5 (SGD project. "Saccharomyces Genome Database" <http://www.yeastgenome.org/>, 2008). Las proteínas Vps2, Vps4, Vps20, Vps22, Vps23, Vps37, Snf7 y End3 participan en la internalización de algunas proteínas de la membrana plasmática, y se seleccionaron como posibles candidatos a interaccionar con las quinasas Hal4 y Hal5 ya que se ha publicado que las cepas mutantes en los genes que codifican estas proteínas muestran sensibilidad a LiCl (Bowers et al., 2004). Esta sensibilidad a litio podría deberse a un menor contenido intracelular de potasio. La proteína quinasa Hog1 se seleccionó como posible candidata a interaccionar con Hal4 y Hal5, ya que se ha descrito que en *Schizosaccharomyces pombe*, la proteína ortóloga de Hog1 interacciona con la

proteína quinasa Hal4 (Wang et al., 2005). La proteína Cnb1 se seleccionó porque parece que regula a Hal5 en respuesta al estrés osmótico (J. Ramos, J. Ariño y L. Yenush, datos no mostrados). 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).

A pesar de no haber encontrado ninguna diana molecular para las proteínas Hal4 y Hal5, a lo largo de este trabajo se ha logrado identificar el mecanismo por medio del cual estas quinasas regulan el transportador de potasio Trk1. Hal4 y Hal5 no son necesarias para la activación del transportador *per se*, sino para mantener los niveles de Trk1 en la membrana plasmática. En el futuro se trabajará en la identificación de los residuos específicos implicados en esta regulación. Se ha comprobado que la actividad de Hal4 y Hal5 influye la estabilidad de otros transportadores de nutrientes, lo que pone de manifiesto una visión más general de la función de estas quinasas. Los experimentos que se realicen a partir de ahora deben determinar si las quinasas Hal4 y Hal5 actúan fosforilando directamente las proteínas transportadoras de la membrana plasmática, o si por el contrario realizan su función de forma indirecta, por ejemplo, antagonizando un complejo de ubiquitin-ligasas, como se ha descrito para Npr1.

VI. CONCLUSIONES

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

1. La concentración intracelular de potasio y el pH citosólico son menores en el mutante *hal4hal5* que en la cepa silvestre.
2. El mutante *hal4hal5* acumula mayores niveles de RNAm relacionados con las categorías funcionales de metabolismo energético y biosíntesis de metionina que la cepa silvestre. En este mismo mutante se produce un menor acúmulo de RNAm relacionados con las categorías funcionales de biosíntesis de adenina y metabolismo de aminoácidos.
3. El mutante *hal4hal5* presenta menores niveles de toma de leucina y metionina que la cepa silvestre. Este mutante también presenta una mejoría en su crecimiento al complementar las rutas biosintéticas de uracilo y triptófano, lo que sugiere un defecto más general en la toma de nutrientes. Esta observación está apoyada por la mayor activación de la ruta GCN (*General Control of Nutrients*) que se ha observado en este mutante.
4. El mutante *hal4hal5* presenta niveles más altos de actividad succinato deshidrogenasa (SDH) que la cepa silvestre, lo que probablemente refleja un aumento del metabolismo aeróbico.
5. En el mutante *hal4hal5*, en medio no suplementado con potasio, la cantidad de Trk1 presente en la membrana plasmática disminuye, y se produce un acúmulo de señal (GFP) en el lumen de la vacuola.
6. La deslocalización del transportador de potasio Trk1 en el mutante *hal4hal5* no se debe a cambios en la fuerza osmótica producidos por la ausencia de KCl.

7. La sobreexpresión de *HAL5* produce la acumulación de Trk1 en la membrana plasmática.
8. La delección de los últimos 35 aminoácidos de Trk1 da lugar a una versión de Trk1 estable en la membrana plasmática incluso en ausencia de *HAL4* y *HAL5*. La expresión de esta versión truncada de Trk1 rescata la sensibilidad a litio y a pH ácido, probablemente restituyendo la toma de potasio (rubidio) de alta afinidad.
9. En los casos de la permeasa de arginina Can1, la permeasa de uracilo Fur4, el transportador de glucosa Hxt1 y la permeasa de aminoácidos Gap1 también se observa una menor cantidad de proteína presente en la membrana plasmática en el mutante *hal4hal5*, estableciendo un mecanismo probable para los fenotipos de ayuno que se han descrito anteriormente.

VII. BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ahmed,A., Sesti,F., Ilan,N., Shih,T.M., Sturley,S.L., y Goldstein,S.A. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell* 99, 283-291.
- Albert,A., Yenush,L., Gil-Mascarell,M.R., Rodriguez,P.L., Patel,S., Martinez-Ripoll,M., Blundell,T.L., y Serrano,R. (2000). X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity. *J Mol. Biol.* 295, 927-938.
- Anderson,J.A., Huprikar,S.S., Kochian,L.V., Lucas,W.J., y Gaber,R.F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 3736-3740.
- Antz,C., Bauer,T., Kalbacher,H., Frank,R., Covarrubias,M., Kalbitzer,H.R., Ruppertsberg,J.P., Baukrowitz,T., y Fakler,B. (1999). Control of K⁺ channel gating by protein phosphorylation: structural switches of the inactivation gate. *Nat. Struct. Biol.* 6, 146-150.
- Bagnat,M., Chang,A., y 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., y 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.
- Banuelos,M.A., Madrid,R., y Rodriguez-Navarro,A. (2000). Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Mol. Microbiol.* 37, 671-679.

- Bañuelos,M.A., Ruiz,M.C., Jimenez,A., Souciet,J.L., Potier,S., y Ramos,J. (2002). Role of the Nha1 antiporter in regulating K(+) influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 9-15.
- Bañuelos,M.A., Sychrova,H., Bleykasten-Grosshans,C., Souciet,J.L., y Potier,S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144 (Pt 10), 2749-2758.
- Barnes,G., Drubin,D.G., y Stearns,T. (1990). The cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 109-115.
- Beck,T., Schmidt,A., y Hall,M.N. (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* 146, 1227-1238.
- Bertl,A., Bihler,H., Reid,J.D., Kettner,C., y Slayman,C.L. (1998). Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membr. Biol.* 162, 67-80.
- Bertl,A., Slayman,C.L., y Gradmann,D. (1993). Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 132, 183-199.
- Bihler,H., Slayman,C.L., y Bertl,A. (2002). Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 109-118.
- Bowers,K., Lottridge,J., Helliwell,S.B., Goldthwaite,L.M., Luzio,J.P., y Stevens,T.H. (2004). Protein-Protein Interactions of ESCRT Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5, 194-210.
- Breinig,F., Tipper,D.J., y Schmitt,M.J. (2002). Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* 108, 395-405.

- Burchett,S.A., Scott,A., Errede,B., y Dohlman,H.G. (2001). Identification of novel pheromone-response regulators through systematic overexpression of 120 protein kinases in yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 26472-26478.
- Causton,H.C., Ren,B., Koh,S.S., Harbison,C.T., Kanin,E., Jennings,E.G., Lee,T.I., True,H.L., Lander,E.S., y Young,R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 12, 323-337.
- Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151-7160.
- Crespo,J.L., Helliwell,S.B., Wiederkehr,C., Demougin,P., Fowler,B., Primig,M., y Hall,M.N. (2004). NPR1 kinase and RSP5-BUL1/2 ubiquitin ligase control GLN3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 37512-37517.
- De Craene,J.O., Soetens,O., y Andre,B. (2001). The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43939-43948.
- de Nadal,E., Clotet,J., Posas,F., Serrano,R., Gomez,N., y Arino,J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7357-7362.
- Durell,S.R. y 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., y 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.

- Esguerra, M., Wang, J., Foster, C.D., Adelman, J.P., North, R.A., y Levitan, I.B. (1994). Cloned Ca²⁺-dependent K⁺ channel modulated by a functionally associated protein kinase. *Nature* 369, 563-565.
- Fairman, C., Zhou, X., y Kung, C. (1999). Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.* 168, 149-157.
- Fleet, G. H. Cell walls. Rose, A. H. y Harrison, J. S. *The yeasts.* 3, 199-277. 1991. London, Academic Press Ltd.
- Forment, J., Mulet, J.M., Vicente, O., y 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.
- Forsberg, H. y Ljungdahl, P.O. (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 40, 91-109.
- Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., y Palmgren, M.G. (1999). Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *J. Biol. Chem.* 274, 36774-36780.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., y 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.
- Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L., y Schneiter, R. (2005). Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* 280, 22515-22522.

-
- Galan,J.M., Moreau,V., Andre,B., Volland,C., y Haguenaer-Tsapis,R. (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946-10952.
 - Garciadeblas,B., Senn,M.E., Banuelos,M.A., y Rodriguez-Navarro,A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* 34, 788-801.
 - Gietz,R.D., Schiestl,R.H., Willems,A.R., y Woods,R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
 - Goffeau,A., Nakai,K., Slonimski,P., Risler,J.L., y Slominski,P. (1993a). The membrane proteins encoded by yeast chromosome III genes. *FEBS Lett.* 325, 112-117.
 - Goffeau,A., Slonimski,P., Nakai,K., y Risler,J.L. (1993b). How many yeast genes code for membrane-spanning proteins? *Yeast* 9, 691-702.
 - Goossens,A., de La,F.N., Forment,J., Serrano,R., y 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.
 - Goossens,A., Dever,T.E., Pascual-Ahuir,A., y Serrano,R. (2001). The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30753-30760.
 - Graham,J.M. (2003). Succinate dehydrogenase assay for mitochondria. Purification of a Crude Mitochondrial Fraction by Density-Gradient Centrifugation. Subcellular fractionation and isolation of organelles. In *Current Protocols in Cell Biology*, J.S.Bonifacino, M.Dasso, J.B.Harford, J.Lippincott-Schwartz, y K.M.Yamada, eds. John Wiley and Sons, Inc.).

- Grenson, M. Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation. De Pont, J. H. M. Molecular aspects of transport proteins. 219-245. 1992. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV.
- Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., y Tanner, W. (2006). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.*
- Hanahan, D. Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning. 1986. Oxford, IRL Press.
- Haro, R., Garcíadeblas, B., y Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291, 189-191.
- Haro, R., Sainz, L., Rubio, F., y Rodríguez-Navarro, A. (1999). Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 31, 511-520.
- Hartl, F.U., Pfanner, N., Nicholson, D.W., y Neupert, W. (1989). Mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 1-45.
- Hayashi, H., Szaszi, K., y Grinstein, S. (2002). Multiple modes of regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976, 248-258.
- Hein, C., Springael, J.Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., y Andre, B. (1995). NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18, 77-87.
- Hicke, L. (1997). Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.* 11, 1215-1226.
- Hicke, L. y Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-287.

-
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., y Tzagoloff, A. (1986). Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167.
 - Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual Review of Microbiology* 59, 407-450.
 - Hinnebusch, A. G. Translational control of GCN4: gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2. Hershey, W. B., Mathews, M. B., y Sonenberg, N. *Translational Control*. 199-244. 1996. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Generic
 - Hirasaki, M., Kaneko, Y., y Harashima, S. (2008). Protein phosphatase Siw14 controls intracellular localization of Gln3 in cooperation with Npr1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 409, 34-43.
 - Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van, N.A., Van, d., V, y Thevelein, J.M. (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends Biochem. Sci.* 29, 556-564.
 - Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem. Sci.* 30, 183-187.
 - Horak, J. (2003). The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 139-155.
 - Hunter, T. y Plowman, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22, 18-22.
 - Johnston, M. y Kim, J.H. (2005). Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 247-252.

- Kakinuma,Y., Maruyama,T., Nozaki,T., Wada,Y., Ohsumi,Y., y Igarashi,K. (1995). Cloning of the gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 985-992.
- Kaouass,M., Audette,M., Ramotar,D., Verma,S., De Montigny,D., Gamache,I., Torossian,K., y Poulin,R. (1997). The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17, 2994-3004.
- Ketchum,K.A., Joiner,W.J., Sellers,A.J., Kaczmarek,L.K., y Goldstein,S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.
- Kim,J.H., Brachet,V., Moriya,H., y Johnston,M. (2006). Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 167-173.
- Ko,C.H., Buckley,A.M., y Gaber,R.F. (1990). TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125, 305-312.
- Ko,C.H. y Gaber,R.F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 4266-4273.
- Korotzer,J.L., Bergquist,L.M., y Searcy,R.L. (1961). Use of cellulose acetate and Ponceau S for electrophoretic serum protein analysis. *Am. J. Med. Technol.* 27, 197-203.
- Lagunas,R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 10, 229-242.
- Lauwers,E. y Andre,B. (2006). Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. *Traffic.* 7, 1045-1059.

-
- Lichtenberg-Frate,H., Reid,J.D., Heyer,M., y Hofer,M. (1996). The SpTRK gene encodes a potassium-specific transport protein TKHp in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Membr. Biol.* 152, 169-181.
 - Lifton,R.P. (1996). Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272, 676-680.
 - Liu,K.H. y Tsay,Y.F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* 22, 1005-1013.
 - Liu,Y., Vidanes,G., Lin,Y.C., Mori,S., y Siede,W. (2000). Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of *Schizosaccharomyces pombe* Chk1 involved in DNA-damage-induced M-phase arrest. *Mol. Gen. Genet.* 262, 1132-1146.
 - Madrid,R., Gomez,M.J., Ramos,J., y Rodriguez-Navarro,A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* 273, 14838-14844.
 - Malinska,K., Malinsky,J., Opekarova,M., y Tanner,W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4427-4436.
 - Maresova,L., Urbankova,E., Gaskova,D., y Sychrova,H. (2006). Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res.* 6, 1039-1046.
 - Mendoza,I., Rubio,F., Rodriguez-Navarro,A., y Pardo,J.M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 8792-8796.

- Merchan,S., Bernal,D., Serrano,R., y 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.
- Miesenbock,G., De Angelis,D.A., y Rothman,J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
- Miller, J. Experiments in Molecular Genetics. Experiments in Molecular Genetics , 352-355. 1972. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Mollapour,M. y Piper,P.W. (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol. Cell Biol.* 27, 6446-6456.
- Moriya,H. y Johnston,M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 1572-1577.
- Mulet,J.M., Leube,M.P., Kron,S.J., Rios,G., Fink,G.R., y 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.
- Mulet,J.M. y Serrano,R. (2002). Simultaneous determination of potassium and rubidium content in yeast. *Yeast* 19, 1295-1298.
- Munson,A.M., Haydon,D.H., Love,S.L., Fell,G.L., Palanivel,V.R., y Rosenwald,A.G. (2004). Yeast ARL1 encodes a regulator of K⁺ influx. *J Cell Sci* 117, 2309-2320.
- Nakamura,T., Yuda,R., Unemoto,T., y Bakker,E.P. (1998). KtrAB, a new type of bacterial K⁽⁺⁾-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 180, 3491-3494.

-
- Narasimhan,J., Staschke,K.A., y Wek,R.C. (2004). Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 22820-22832.
 - Nikko,E., Marini,A.M., y Andre,B. (2003). Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 50732-50743.
 - Nozaki,T., Nishimura,K., Michael,A.J., Maruyama,T., Kakinuma,Y., y Igarashi,K. (1996). A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228, 452-458.
 - O'Rourke,S.M. y Herskowitz,I. (2004). Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol. Biol. Cell* 15, 532-542.
 - Oehlen,B. y Cross,F.R. (1994). Signal transduction in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 836-841.
 - Ozcan,S. y Johnston,M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 554-569.
 - Pollard,T.D. y Earnshaw,W.C. (2002). *Cell Biology*. (Philadelphia: Saunders).
 - Prista,C., Gonzalez-Hernandez,J.C., Ramos,J., y Loureiro-Dias,M.C. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 153, 3034-3043.
 - Proft,M. y Struhl,K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 118, 351-361.

- Ramos,J., Alijo,R., Haro,R., y Rodriguez-Navarro,A. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176, 249-252.
- Rank, G. H. y Robertson, A. J. Protein and lipid composition of the yeast plasma membrane. Spencer, J. F. T., Spencer, D. M., y Smith, A. R. W. *Yeast genetics, fundamental and applied aspects.* 225-241. 1983. Berlin, Springer-Verlag KG.
- Rios,G., Ferrando,A., y Serrano,R. (1997). Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 515-528.
- Rodriguez-Navarro,A. y Ramos,J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 940-945.
- Rolland,F., Winderickx,J., y Thevelein,J.M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2, 183-201.
- Rotin,D., Staub,O., y 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. y Schmidt,M.C. (2007). Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 6, 571-583.
- Sakumoto,N., Mukai,Y., Uchida,K., Kouchi,T., Kuwajima,J., Nakagawa,Y., Sugioka,S., Yamamoto,E., Furuyama,T., Mizubuchi,H., Ohsugi,N., Sakuno,T., Kikuchi,K., Matsuoka,I., Ogawa,N., Kaneko,Y., y Harashima,S. (1999). A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1669-1679.
- Schachtman,D.P. y Schroeder,J.I. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370, 655-658.

-
- Schmidt,A., Beck,T., Koller,A., Kunz,J., y Hall,M.N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* 17, 6924-6931.
 - Sentenac,H., Bonneaud,N., Minet,M., Lacroute,F., Salmon,J.M., Gaymard,F., y Grignon,C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256, 663-665.
 - Serrano,R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165, 1-52.
 - Serrano,R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, J.R.Broach, J.R.Pringle, y E.W.Jones, eds. Cold Springs Harbor Press).
 - Serrano,R., Gancedo,J.M., y Gancedo,C. (1973). Assay of yeast enzymes in situ. A potential tool in regulation studies. *Eur. J. Biochem.* 34, 479-482.
 - Serrano,R., Mulet,J.M., Rios,G., Marquez,J.A., de Larrinoa,I.F., Leube,M.P., Mendizabal,I., Pascual-Ahuir,A., Proft,M., Ros,R., y Montesinos (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress in plants. *J. Exp. Botany* 50, 1023-1036.
 - Sesti,F., Shih,T.M., Nikolaeva,N., y Goldstein,S.A. (2001). Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell* 105, 637-644.
 - Simon,R.M. y Dobbin,K. (2003). Experimental Design of DNA Microarray Experiments. *Biotechniques* 34, 16-21.
 - Soetens,O., De Craene,J.O., y 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.

- Soldatenkov,V.A., Velasco,J.A., Avila,M.A., Dritschilo,A., y Notario,V. (1995). Isolation and characterization of SpTRK, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K⁺ transporter protein. *Gene* 161, 97-101.
- Spielowoy,N., Flick,K., Kalashnikova,T.I., Walker,J.R., y Wittenberg,C. (2004). Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* 24, 8994-9005.
- Stein, W. D. Channels, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport. 1990. Academic Press.
- Tate,J.J., Rai,R., y Cooper,T.G. (2006). Ammonia-specific regulation of Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase Npr1. *J. Biol. Chem.* 281, 28460-28469.
- Tusher,V.G., Tibshirani,R., y Chu,G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5116-5121.
- Umabayashi,K. y Nakano,A. (2003). Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* 161, 1117-1131.
- Vallejo,C.G. y Serrano,R. (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* 5, 307-319.
- Vandenbol,M., Jauniaux,J.C., y 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.
- Vida,T.A. y Emr,S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128, 779-792.
- Walther,T.C., Brickner,J.H., Aguilar,P.S., Bernales,S., Pantoja,C., y Walter,P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998-1003.

- Wang,L.Y., Shimada,K., Morishita,M., y Shiozaki,K. (2005). Response of fission yeast to toxic cations involves cooperative action of the stress-activated protein kinase Spc1/Sty1 and the Hal4 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 25, 3945-3955.
- Wang,T.B., Gassmann,W., Rubio,F., Schroeder,J.I., y Glass,A.D. (1998). Rapid Up-regulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol* 118, 651-659.
- Wang,Y.T., Yu,X.M., y Salter,M.W. (1996). Ca(2+)-independent reduction of N-methyl-D-aspartate channel activity by protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1721-1725.
- Warringer,J. y Blomberg,A. (2003). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 53-67.
- Westermann,B. y Neupert,W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Yang,R., Wek,S.A., y Wek,R.C. (2000). Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 20, 2706-2717.
- Yenush,L., Merchan,S., Holmes,J., y 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., y 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.
- Zolnierowicz,S. y Bollen,M. (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases. *De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. EMBO J.* 19, 483-488.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS:

- "Saccharomyces Genome Database"
<http://www.yeastgenome.org/>, 2008.
- "GO Term Finder. The Gene Ontology Consortium"
<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/GO/goTermFinder>, 2008.

ANEXO I

Genes seleccionados como inducidos o reprimidos en los distintos experimentos de análisis global de la expresión génica

EXPERIMENTO MICROARRAYS WT vs. *hal4hal5* en YPD pH 4.5 (Fondo genético W303)

GENES INDUCIDOS

Gene ID	Gen name	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
YGL121C		11,68301581	4,8115	0,411837156	0
YBR072W	HSP26	11,80679953	4,5305	0,383719567	0
YER150W	SPI1	12,04824337	4,396	0,364866468	0
YFL014W	HSP12	15,69223564	4,286	0,273128705	0
YIR019C	MUC1	5,214570623	3,8933125	0,746621876	0
YFL015C		8,257735533	3,759	0,455209541	0
YPL280W		5,352534701	3,72525	0,695978673	0
YMR175W	SIP18	5,220303366	3,35825	0,643305525	0
YGR043C		11,45686954	3,1615	0,27594798	0
YLO53C-a		7,646051211	3,14475	0,411290732	0
YPL187W	MF α 1	9,688313023	3,139375	0,324037321	0
YGL166W	CUP2	5,623895747	2,91275	0,517923897	0
YCR005C	CIT2	15,72943862	2,8585	0,181729308	0
YLR092W	SUL2	8,624397682	2,8145	0,32634163	0
YMR105C	PGM2	10,0457786	2,81375	0,280092775	0
YFL012W		11,40716723	2,78425	0,244079003	0
YML128C	MSC1	13,02778793	2,74825	0,210952927	0
YNL160W	YGP1	10,38657987	2,738	0,263609392	0
YJL161W		8,350555773	2,73475	0,327493172	0
YCL040W	GLK1	10,89515227	2,728	0,250386588	0
YDR216W	ADR1	9,528087078	2,721525	0,285631835	0
YKL026C	GPX1	9,23875024	2,716	0,293979156	0
YOR120W	GCY1	10,14931813	2,69875	0,265904563	0
YOR289W		9,104499696	2,65025	0,291092327	0
YOR121C		7,988163889	2,5805	0,323040443	0
YMR173W-a		12,08443147	2,5255	0,208987904	0
YBR116C		12,15704717	2,525	0,207698462	0
YBR054W	YRO2	12,40880477	2,5055	0,201913081	0
YMR173W	DDR48	10,27671452	2,5045	0,243706293	0
YAR028W		13,72253185	2,44325	0,17804659	0
YPR184W	GDB1	9,838672698	2,43625	0,247619783	0
YIR017C	MET28	8,350418461	2,40425	0,287919703	0
YIR137C	ECM17	9,363397304	2,349	0,250870483	0
YMR251W-a	HOR7	9,544228181	2,31625	0,242685941	0
YKR076W	ECM4	8,470254748	2,2415	0,264631946	0
YMR250W	GAD1	8,743375593	2,197	0,251275949	0
YEL011W	GLC3	10,24836437	2,19	0,213692636	0
YBL078C	AUT7	9,163499858	2,1615	0,23588149	0
YJR010W	MET3	10,04385716	2,1575	0,214807914	0
YMR174C	PAI3	7,57683867	2,15725	0,28471637	0
YBL049W		12,5293108	2,13275	0,170220855	0
YFR053C	HXK1	8,871098562	2,125	0,239541922	0
YJL079C	PRY1	6,404804543	2,12025	0,331040547	0
YBL015W	ACH1	11,91482794	2,10425	0,17660767	0
YGR008C	STF2	7,320668856	2,09075	0,285595489	0

YBR169C	SSE2	6,509782014	2,09025	0,321093701	0
YML100W	TSL1	5,734940983	2,0845	0,363473662	0
YNL274C		8,354559706	2,08025	0,248995767	0
YMR090W		9,965808475	2,0725	0,207961051	0
YBL064C		7,054325343	2,0665	0,292728206	0
YLR178C	TFS1	7,22274862	2,059	0,28507153	0
YBR230C		7,03087741	2,05525	0,292317712	0
YOR203W		7,059384598	1,97675	0,280017326	0
YKL151C		9,059062969	1,96775	0,217213415	0
YDL014W	NOP1	10,19401862	1,9465	0,190945305	0
YMR169C	ALD3	7,455094377	1,94475	0,260861889	0
YOR202W	HIS3	9,298964593	1,94325	0,208974879	0
YNL015W	PBI2	9,206748052	1,9405	0,210769317	0
YDL124W		8,543030496	1,93125	0,226061466	0
YOR391C		6,208061694	1,931	0,311047167	0
YBR126C	TPS1	10,00384336	1,93	0,192925852	0
YKL001C	MET14	6,813555964	1,914	0,280910586	0
YPR167C	MET16	9,676407355	1,90675	0,19705144	0
YFR030W	MET10	8,960684866	1,88525	0,210391285	0
YGL156W	AMS1	6,984123796	1,869	0,26760694	0
YLR303W	MET17	6,313565833	1,865	0,295395669	0
YDL169C	UGX2	6,392462995	1,8645	0,291671614	0
YEL060C	PRB1	8,658709394	1,86325	0,215187959	0
YPL223C	GRE1	7,696802829	1,854125	0,240895478	0
YBR285W		5,697495886	1,854	0,325406115	0
YGL184C	STR3	5,97989431	1,84625	0,308742915	0
YML054C	CYB2	8,014921436	1,82925	0,228230559	0
YAR010C		3,745576583	1,8285	0,488175841	0
YBR299W	MAL32	6,368562628	1,8055	0,283501962	0
YER067W		7,320158572	1,7985	0,245691399	0
YJL048C		8,751762289	1,797	0,205330074	0
YML120C	NDI1	7,568783273	1,78475	0,235804083	0
YDR178W	SDH4	5,621443393	1,749	0,311130056	0
YAL061W		8,080396978	1,74825	0,216356944	0
YJR026W		4,150726783	1,72325	0,415168256	0
YPL186C	UIP4	8,19130444	1,71825	0,209765125	0
YMR170C	ALD2	6,182895932	1,6975	0,274547723	0
YHR071W	PCL5	8,700062514	1,69225	0,194510097	0
YDL223C	HBT1	6,259087606	1,689175	0,269875596	0
YMR153W	NUP53	3,449786301	1,68875	0,489523076	0
YJL217W		8,957411934	1,66025	0,185349296	0
YGR248W	SOL4	6,36116048	1,658	0,260644265	0
YKL097W-A		3,830699332	1,65225	0,431318111	0
YML040W		3,727108262	1,65225	0,443306146	0
YEL041W		8,325064563	1,6515	0,19837684	0
YML045W		3,790616858	1,641	0,43291107	0
YKL071W		4,716847924	1,6405	0,347795822	0
YKL103C	LAP4	6,942267321	1,63475	0,235477824	0
YNL200C		5,097849777	1,619	0,317584878	0
YGL088W		5,130964984	1,61425	0,314609436	0
YKR069W	MET1	7,766764599	1,60925	0,207196958	0
YMR158W-a		5,454747135	1,60375	0,294009962	0

YMR181C		5,771254426	1,5975	0,276802907	0
YMR211W	DML1	3,36323244	1,58825	0,472239141	0
YDR258C	HSP78	9,547848728	1,58425	0,16592743	0
YOR215C		9,183832909	1,57875	0,171905349	0
YKL093W	MBR1	5,495960134	1,56725	0,285164004	0
YJR027W		5,606060551	1,563	0,278805408	0
YER158C		8,071113887	1,55425	0,192569455	0
YKR039W	GAP1	7,842622249	1,54875	0,197478592	0
YLL026W	HSP104	6,737875795	1,53425	0,227705296	0
YJL160C		2,945286691	1,5325	0,520322862	0
YJL016W		7,327598311	1,52525	0,208151421	0
YBR269C		6,41809887	1,51675	0,236323876	0
YDR379C-a		5,743148558	1,514	0,263618464	0
YBR053C		5,689169818	1,49725	0,26317548	0
YGL037C	PNC1	5,353597795	1,49525	0,279298157	0
YHR092C	HXT4	6,405899256	1,49275	0,233027392	0
YHR104W	GRE3	5,43078066	1,4875	0,27390169	0
YMR081C	ISF1	5,628698861	1,482	0,263293531	0
YGR070W	ROM1	8,276520167	1,481	0,178939937	0
YEL071W	DLD3	8,717137231	1,46025	0,167514857	0
YJL066C	MPM1	7,497411134	1,449	0,193266712	0
YJL164C	TPK1	8,405007058	1,4455	0,171980819	0
YJR028W		4,178213133	1,44	0,344644937	0
YLR142W	PUT1	6,901755055	1,43525	0,207954352	0
YOL152W	FRE7	6,637265238	1,43025	0,215487848	0
YMR325W		5,060984339	1,43005	0,282563609	0
YIL015C-A		5,206895447	1,419425	0,272604859	0
YKL150W	MCR1	5,729899867	1,4185	0,247561045	0
YHR087W		4,787997559	1,4165	0,295843927	0
YBL048W		5,536881243	1,415625	0,255671909	0
YOL082W	CVT19	6,027922237	1,4	0,232252498	0
YIR016W		6,963490714	1,39475	0,200294659	0
YEL044W	IES6	5,908898892	1,3865	0,234646086	0
YBR006W	UGA2	5,773456478	1,383	0,239544544	0
YCL027C-a		6,21674829	1,375825	0,221309427	0
YLR345W		6,409814459	1,37175	0,214007755	0
YER098W	UBP9	6,113433649	1,37175	0,224382905	0
YMR199W	CLN1	6,81466734	1,37025	0,201073645	0
YBR117C	TKL2	4,697792268	1,346	0,286517565	0
YCR091W	KIN82	3,750495028	1,33825	0,356819564	0
YMR068W		2,773027534	1,3315	0,480161118	0
YJL006C	CTK2	4,300132029	1,33	0,309292829	0
YOL083W		6,42939432	1,325	0,206084731	0
YKL085W	MDH1	7,592409742	1,32475	0,17448347	0
YGR019W	UGA1	5,529380037	1,3235	0,239357756	0
YMR195W	ICY1	5,193706153	1,3205	0,254250041	0
YJL170C	ASG7	5,902649117	1,3135	0,222527203	0
YHR112C		7,556072731	1,3065	0,172907282	0
YJR096W		7,035154322	1,306	0,18563914	0
YMR291W		6,221768894	1,297	0,208461616	0
YNL055C	POR1	4,659784693	1,297	0,27833904	0
YLR438W	CAR2	4,656017998	1,293	0,277705112	0

YOR227W		5,303291239	1,2795	0,241265271	0
YKL016C	ATP7	7,314429243	1,279	0,17485985	0
YILO60W	BNA3	6,017214123	1,2725	0,211476603	0
YIRO78W	BNA2	4,297417873	1,26925	0,295351776	0
YOR383C	FIT3	3,270948177	1,269	0,3879609	0
YLR080W	EMP46	4,938124906	1,26775	0,256727001	0
YILO42W	MHP1	5,030936457	1,26525	0,251493934	0
YIL144W	TID3	5,670212057	1,26375	0,222875262	0
YKL091C		5,897821797	1,26225	0,214019691	0
YIRO38C	GTT1	7,277952217	1,26	0,173125621	0
YIL151C	SNA3	5,118068567	1,25675	0,245551615	0
YKR058W	GLG1	6,160676437	1,252	0,203224437	0
YNL072W	RNH35	5,244197498	1,25175	0,238692383	0
YDR058C	TGL2	5,360266587	1,2435	0,231984731	0
YIRO29W		4,236951118	1,2325	0,290893137	0
YER053C		6,431272909	1,218	0,18938708	0
YBR177C	EHT1	3,28507017	1,2155	0,370007317	0
YBR026C	MRF1'	6,688344726	1,215	0,181659297	0
YER163C		4,749318168	1,21475	0,255773557	0
YDL027C		5,003368516	1,214	0,242636535	0
YMR110C		5,642914274	1,20725	0,213940872	0
YKL066W		5,705466496	1,207	0,211551501	0
YER054C	GIP2	3,850347207	1,20625	0,313283435	0
YIRO32C	DAL3	4,956123419	1,2	0,242124721	0
YILO52W	TDH1	3,500716969	1,19675	0,341858542	0
YKL043W	PHD1	6,625693168	1,19225	0,179943437	0
YGR279C	SCW4	3,977339504	1,19175	0,299634969	0
YDR055W	PST1	7,066354691	1,191	0,168545177	0
YFL010C	WWM1	5,625989081	1,191	0,211696109	0
YOL126C	MDH2	4,766306295	1,19	0,249669225	0
YLR109W	AHP1	5,314246422	1,18975	0,223879343	0
YIL112W		4,291997187	1,18275	0,27557101	0
YLR270W		5,245617727	1,18225	0,225378604	0
YBR149W	ARA1	5,570421771	1,181	0,212012671	0
YGL248W	PDE1	5,474667899	1,17975	0,215492523	0
YML131W		4,546253808	1,17575	0,258619525	0
YER081W	SER3	6,62141552	1,175	0,177454503	0
YIL107C	PFK26	4,509404948	1,16475	0,258293503	0
YDR077W	SED1	3,51836388	1,1645	0,330977704	0
YIRO42C		4,451786641	1,15775	0,260064126	0
YHL021C		4,115547693	1,1505	0,27954967	0
YCL020W		2,381214743	1,14825	0,482211864	0
YDR533C		6,809336095	1,14475	0,168114774	0
YPR117W		5,132882273	1,14075	0,222243554	0
YHR008C	SOD2	4,61687626	1,13975	0,246866049	0
YIL144W		3,790378718	1,137	0,299970025	0
YFL054C		3,588918689	1,136138889	0,316568579	0
YGR088W	CTT1	6,471086274	1,13475	0,175356957	0
YIL142C		4,8702714	1,133	0,232635906	0
YGR154C		4,172790124	1,128	0,270322726	0
YOL071W		5,575813607	1,1275	0,202212642	0
YML070W	DAK1	5,16459141	1,1265	0,218119869	0

YLR149C		5,104944659	1,125	0,220374573	0
YAL060W	BDH1	5,590903529	1,124	0,20104085	0
YLR023C		5,181424246	1,12375	0,216880523	0
YDR516C		5,911693212	1,123	0,189962496	0
YMR114C		6,109758269	1,12275	0,183763408	0
YJL159W	HSP150	3,742831372	1,1085	0,296166161	0
YIL045W	PIG2	5,167041788	1,10575	0,214000592	0
YER088C	DOT6	6,343748478	1,1035	0,173950781	0
YBR241C		4,903586405	1,10275	0,224886422	0
YER159C	BUR6	4,950051204	1,0925	0,220704788	0
YOL106W		3,670728273	1,091	0,297216225	0
YKL044W		2,957385968	1,08225	0,365948176	0
YLR446W		4,154403751	1,08025	0,26002528	0
YKR024C	DBP7	4,230664003	1,078	0,254806338	0
YKL163W	PIR3	3,489585875	1,0775	0,308775894	0
YMR265C		2,49156594	1,0765	0,4320576	0
YNL145W	MFA2	3,31516652	1,073	0,323663983	0
YGL059W		5,655338283	1,07125	0,189422798	0
YLR290C		5,943869194	1,069	0,17984918	0
YDR391C		4,976241143	1,0675	0,214519347	0
YLR257W		4,742656348	1,06675	0,224926691	0
YHR053C	CUP1-1	5,134701972	1,05575	0,205610765	0
YER124C	DSE1	4,043091143	1,05575	0,261124462	0
YEL072W		5,009389205	1,05325	0,210255174	0
YFR049W	YMR31	5,397707778	1,05225	0,194943862	0
YIL111W	COX5B	3,083868596	1,05025	0,3405625	0
YPR026W	ATH1	2,706657015	1,048041667	0,387208893	0
YCL025C	AGP1	5,104747745	1,04775	0,205250103	0
YJL158C	CIS3	4,269410801	1,04725	0,245291458	0
YDR357C		4,00816969	1,04275	0,260156151	0
YAL028W		3,910695249	1,0415	0,266320931	0
YHR016C	YSC84	3,620149738	1,03725	0,286521297	0
YKL124W	SSH4	4,261070555	1,03575	0,243072718	0
YBR128C	APG14	5,935029155	1,034	0,174219869	0
YJR025C	BNA1	5,232665392	1,0295	0,196744856	0
YML030W		5,141542482	1,0285	0,200037246	0
YCR083W	TRX3	4,763837331	1,02725	0,215634987	0
YKR005C		2,44173471	1,027	0,420602613	0
YGL015C		4,044212213	1,025	0,253448619	0
YBL033C	RIB1	6,410098046	1,0215	0,159357937	0
YLR042C		2,733835624	1,017678571	0,372253022	0
YDR148C	KGD2	5,215239089	1,0165	0,194909568	0
YAR050W	FLO1	5,027707726	1,0135	0,201582919	0
YGR194C	XKS1	4,461708597	1,011	0,226594807	0
YIR039C	YPS6	3,42679941	1,008583333	0,294322256	0
YCL035C	GRX1	5,431037551	1,00825	0,185645927	0
YPL221W	BOP1	4,960793162	1,00525	0,202638967	0
YKL133C		4,565561886	1,00375	0,219852457	0
YDR248C		4,223039157	1,00375	0,237684275	0
YJL221C	FSP2	4,5003195	1,001583333	0,222558272	0
YHR018C	ARG4	5,686707685	1,00025	0,175892635	0
YDR530C	APA2	4,019318299	0,99975	0,24873621	0

YIL017W		4,699504089	0,999	0,212575621	0
YGL032C	AGA2	3,708659415	0,99825	0,269167343	0
YNL003C	PET8	4,372778794	0,995	0,227544097	0
YOR204W	DED1	3,860745131	0,99275	0,257139481	0
YGL062W	PYC1	5,936099372	0,99175	0,16707099	0
YIL169C		3,742685127	0,99175	0,264983552	0
YJR155W	AAD10	4,848270812	0,9915	0,204505903	0
YDL204W		4,244115533	0,99125	0,233558675	0
YAL008W	FUN14	5,286885438	0,988	0,186877513	0
YDL239C	ADY3	3,382181507	0,98725	0,291897404	0
YOR010C	TIR2	2,967085116	0,98475	0,331891389	0
YBR256C	RIB5	5,63192337	0,98325	0,174585117	0
YNL208W		4,400680903	0,977	0,222011098	0
YLR218C		4,472530426	0,97675	0,218388676	0
YLR193C		5,866606686	0,97575	0,166322723	0
YBR067C	TIP1	3,783550806	0,97475	0,257628363	0
YBR203W		3,873561014	0,9735	0,251319134	0
YJR059W	PTK2	3,525015751	0,97225	0,27581437	0
YHR055C	CUP1-2	3,66368356	0,96625	0,263737297	0
YIL172C		4,413100225	0,963	0,218213943	0
YJR019C	TES1	3,499638635	0,9605	0,274456908	0
YHR001W-A	QCR10	3,916883672	0,95975	0,245028977	0
YCR073C	SSK22	4,016306278	0,955611111	0,237932828	0
YLR251W		3,443999271	0,954	0,277003543	0
YIR018W	YAP5	2,580613149	0,9515	0,368710824	0
YHR080C		2,417814639	0,9491	0,392544567	0
YDR085C	AFR1	4,416313121	0,9455	0,214092609	0
YHR176W		5,158387931	0,94425	0,183051374	0
YOR222W	ODC2	4,657626312	0,944	0,202678347	0
YFR033C	QCR6	4,845717601	0,94375	0,194759596	0
YGR143W	SKN1	4,237522072	0,9435	0,222653707	0
YGR209C	TRX2	4,343576617	0,943	0,217102191	0
YLR258W	GSY2	3,874505444	0,94225	0,243192328	0
YCR021C	HSP30	5,412443001	0,936	0,172934847	0
YBR225C-a		4,64378709	0,93375	0,20107511	0
YOR036W	PEP12	4,817735913	0,93275	0,19360754	0
YPR098C		4,379523697	0,9325	0,212922698	0
YNL332W	THI12	3,653162957	0,932425	0,255237724	0
YIL166W	QCR8	6,119691688	0,92725	0,151519071	0
YBR001C	NTH2	3,953699767	0,927	0,234463934	0
YOR178C	GAC1	3,53530462	0,9265	0,262070769	0
YOR344C	TYE7	4,459889528	0,92625	0,207684516	0
YBR056W		4,48195303	0,926	0,20660636	0
YIL154C	IMP2'	4,335985015	0,92325	0,212927396	0
YIL119C		3,053813748	0,919875	0,30122171	0
YGR174C	CBP4	4,685366125	0,9185	0,196035907	0
YDR031W		4,561837648	0,9175	0,201125088	0
YLR089C		4,009570209	0,91575	0,228391062	0
YGL125W	MET13	4,227504994	0,91525	0,216498857	0
YKR016W		4,266346225	0,9135	0,214117643	0
YDL181W	INH1	4,331911019	0,90975	0,210011239	0
YOL077W-A	ATP19	5,123526302	0,9055	0,176733747	0

YKR098C	UBP11	4,241788636	0,90075	0,212351458	0
YMR053C	STB2	5,072068912	0,899944444	0,177431431	0
YMR040W		2,696802738	0,898	0,332986906	0
YHL050C		3,238619139	0,8975	0,277124281	0
YPL078C	ATP4	4,286734371	0,89725	0,209308514	0
YLR370C	ARC18	3,533898886	0,89625	0,253615066	0
YBL001C	ECM15	3,728709678	0,896	0,240297604	0
YER035W	EDC2	3,595295823	0,89475	0,248866865	0
YKR075C		3,845175085	0,894	0,232499166	0
YEL077C		5,087485112	0,8905	0,175037367	0
YDR529C	QCR7	5,076443344	0,88925	0,175171856	0
YHR106W	TRR2	4,363698477	0,88225	0,202179414	0
YLR423C	APG17	4,43255631	0,88075	0,198700239	0
YHR113W		5,328732227	0,87675	0,164532568	0
YLL041C	SDH2	4,479955192	0,87675	0,195705082	0
YMR261C	TPS3	3,84935973	0,87675	0,227765151	0
YGL259W	YPS5	4,477284832	0,876	0,195654293	0
YLR385C		4,355293415	0,87475	0,200847547	0
YJL003W		4,597887275	0,87275	0,189815441	0
YER033C	ZRG8	4,127129085	0,8706	0,210945668	0
YER109C	FLO8	3,457501078	0,8699375	0,251608743	0
YOR009W	TIR4	2,716308918	0,869	0,31991943	0
YGR258C	RAD2	5,151347176	0,86725	0,168354019	0
YOR374W	ALD4	5,196669263	0,865	0,166452771	0
YJL017W		4,042346563	0,865	0,213984622	0
YDR070C		3,109389196	0,863	0,277546472	0
YAL063C	FLO9	4,698948862	0,861	0,183232469	0
YDR461W	MFA1	5,226908637	0,860527778	0,164634172	0
YBL045C	COR1	4,704504166	0,8605	0,182909818	0
YLR081W	GAL2	2,870178624	0,85875	0,299197406	0
YHL028W	WSC4	3,078863191	0,85825	0,278755484	0
YEL009C	GCN4	4,600168085	0,857	0,18629754	0
YGL226W		3,746764472	0,85625	0,228530511	0
YER042W	MXR1	5,05594338	0,853	0,168712332	0
YJR021C	REC107	3,84952387	0,8525	0,221455959	0
YJR154W		4,134466097	0,851025	0,205836734	0
YFR003C		4,365292745	0,85	0,194717754	0
YGL253W	HXK2	3,917593774	0,84875	0,216650845	0
YBR096W		3,327350565	0,8485	0,255007696	0
YDR342C	HXT7	3,505094444	0,84375	0,240721046	0
YKL023W		4,445278726	0,84225	0,189470684	0
YOL150C		3,75836775	0,8415	0,223900389	0
YGR244C	LSC2	4,389735718	0,839	0,191127679	0
YBL019W	APN2	4,956598092	0,83675	0,168815382	0
YDR074W	TPS2	4,009229944	0,8365	0,208643558	0
YIL157C		4,664125638	0,83625	0,179294055	0
YAL017W	FUN31	4,606660028	0,8355	0,181367845	0
YKR077W		4,952091525	0,83425	0,168464172	0
YBL099W	ATP1	3,512316972	0,834	0,237450095	0
YKL109W	HAP4	4,165339125	0,83375	0,200163774	0
YPL271W	ATP15	4,189086027	0,83275	0,198790379	0
YKR049C		3,744606687	0,83275	0,222386507	0

YKL007W	CAP1	4,321565249	0,8325	0,192638535	0
YLR136C	TIS11	4,353486852	0,82975	0,190594351	0
YOR363C	PIP2	3,563148048	0,8297	0,232855887	0
YDR543C		4,272799111	0,82775	0,193725466	0
YMR030W		3,921595684	0,82575	0,210564797	0
YJR073C	OPI3	3,293427836	0,82475	0,250422976	0
YJR085C		3,473357052	0,82425	0,237306441	0
YJR008W		3,696684531	0,82275	0,222564299	0
YDL085W	NDE2	5,142001771	0,821	0,159665445	0
YLR281C		3,738946343	0,821	0,219580578	0
YMR051C		3,809758255	0,81925	0,215039891	0
YIL162W	SUC2	3,372063622	0,81925	0,242952118	0
YPL167C	REV3	4,381578688	0,817825	0,186650762	0
YIL124W	AYR1	4,382413292	0,81775	0,186598101	0
YEL012W	UBC8	3,269524777	0,81575	0,249501091	0
YHR219W		3,011504887	0,8125	0,269798666	0
YER065C	ICL1	3,824137876	0,81025	0,211877821	0
YBR204C		4,537994063	0,8085	0,178162419	0
YBL059W		3,364936148	0,8085	0,240272018	0
YMR304C-A		4,324999099	0,808	0,186820848	0
YEL065W	SIT1	4,005616055	0,804175	0,200761878	0
YLR271W		3,84742268	0,8035	0,208841104	0
YILO55W		4,502402454	0,79875	0,177405287	0
YIL155C	FBP26	3,677336369	0,79875	0,217208849	0
YDL004W	ATP16	3,203656737	0,79875	0,249324464	0
YLR286C	CTS1	3,15823091	0,79875	0,252910576	0
YBR138C	HDR1	3,392298263	0,79775	0,235165053	0
YJR115W		3,685140399	0,795075	0,215751617	0
YOR173W		3,525540164	0,79325	0,225000982	0
YDL215C	GDH2	4,383785076	0,79275	0,180836876	0
YBR262C		3,511770445	0,7915	0,225384891	0
YOR292C		3,583605502	0,79125	0,220797183	0
YCL063W		3,27021568	0,79	0,241574281	0
YOL096C	COQ3	2,972571389	0,79	0,265763172	0
YOL041C	NOP12	3,164648973	0,7885	0,249158756	0
YLR272C	YCS4	3,465197209	0,78715	0,227158789	0
YPL166W		2,551213205	0,786125	0,308137712	0
YDR377W	ATP17	3,774732379	0,7855	0,208094223	0
YKL065C	YET1	3,497710085	0,78475	0,224361077	0
YJR043C		3,632354492	0,778	0,214186143	0
YKR011C	TOS5	3,771325245	0,77725	0,206094662	0
YIRO44C		3,320480816	0,77725	0,234077546	0
YKL035W	UGP1	3,945738891	0,7745	0,196287697	0
YML004C	GLO1	3,918354657	0,771	0,196766262	0
YDR358W	GGA1	4,330806676	0,7695	0,177680524	0
YER177W	BMH1	4,491260156	0,76725	0,170831787	0
YGR255C	COQ6	3,431646636	0,76725	0,223580712	0
YMR287C	MSU1	2,209078758	0,76725	0,347316725	0
YDL240W	LRG1	3,049265561	0,76475	0,250798097	0
YJR127C	ZMS1	4,653009794	0,7645	0,164302255	0
YKL061W		3,855080832	0,76275	0,197855774	0
YDR218C	SPR28	3,71102287	0,7605	0,204930022	0

YDL026W		3,930047513	0,75975	0,193318274	0
YLL040C	VPS13	3,15540846	0,7595	0,24069784	0
YLR151C	PCD1	4,097954725	0,7575	0,184848309	0
YFR045W		3,38560312	0,756	0,223298471	0
YER063W	TH01	3,96970253	0,75375	0,189875688	0
YCR009C	RVS161	4,444211919	0,7535	0,16954637	0
YMR041C		4,012761202	0,75025	0,186966022	0
YDL023C		3,877417517	0,749	0,193169809	0
YDR274C		3,050730843	0,74675	0,244777412	0
YHR086W	NAM8	4,531019508	0,7465	0,164753208	0
YJR061W		3,477269803	0,74625	0,214608024	0
YGR183C	QCR9	4,00022034	0,746	0,186498973	0
YBR223C	TDP1	2,696539714	0,74575	0,276558137	0
YDR322C-A	TIM11	3,93920531	0,745	0,18912444	0
YBR270C		3,99079815	0,742	0,18592772	0
YDL238C		3,021125234	0,74	0,244941849	0
YLR120C	YPS1	4,041395184	0,73775	0,182548344	0
YNL289W	PCL1	3,833252781	0,7375	0,192395347	0
YOR054C		3,216895932	0,73675	0,229025127	0
YBR083W	TEC1	3,269926974	0,7345	0,224622753	0
YCR054C	CTR86	1,732934526	0,7335	0,423270464	0,0186394
YMR311C	GLC8	3,368689183	0,73325	0,217666267	0
YDR022C	CIS1	2,904964893	0,7325	0,25215451	0
YML027W	YOX1	4,040032518	0,73225	0,181248541	0
YJR142W		4,263728462	0,732	0,171680726	0
YGR069W		2,014797788	0,732	0,363311894	0,0075167
YGR015C		4,061832123	0,73125	0,180029597	0
YGR048W	UFD1	4,554463523	0,73025	0,160337216	0
YGR028W	MSP1	3,778519812	0,729	0,192932692	0
YGR080W	TWF1	2,98734688	0,72825	0,243778185	0
YJR121W	ATP2	3,941810616	0,724	0,183671939	0
YIL164C	NIT1	3,560667078	0,72275	0,202981628	0
YDL022W	GPD1	3,206052456	0,72275	0,225432993	0
YKL195W		3,361160055	0,721	0,214509273	0
YDL055C	PSA1	2,850430483	0,72025	0,252681132	0
YJL018W		2,527676244	0,71625	0,28336303	0
YDR030C	RAD28	2,462957079	0,71625	0,290808965	0
YDR171W	HSP42	3,718128605	0,7145	0,192166564	0
YGL208W	SIP2	3,759448996	0,71225	0,189455955	0
YBR039W	ATP3	3,482038017	0,71175	0,204406154	0
YDR231C	COX20	3,493077056	0,711	0,203545467	0
YCL017C	NFS1	2,901979901	0,71075	0,244918995	0
YILO55C		3,319563938	0,70775	0,213205714	0
YDR298C	ATP5	3,187786476	0,7055	0,221313443	0
YJR106W	ECM27	3,105207202	0,70475	0,22695748	0
YIR024C	GIF1	3,508176064	0,70375	0,200602817	0
YER101C	AST2	3,96269162	0,7035	0,177530847	0
YDR513W	TTR1	3,001655329	0,701	0,233537806	0

GENES REPRIMIDOS

Gene ID	Gene name	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
YMR120C	ADE17	-8,99833963	-2,81325	0,312641011	0
YOR128C	ADE2	-9,23249913	-2,4285	0,263038205	0
YBR068C	BAP2	-12,6590907	-2,41425	0,19071275	0
YAR015W	ADE1	-9,83833314	-2,38775	0,242698633	0
YLR359W	ADE13	-11,481546	-2,26475	0,19725131	0
YDR399W	HPT1	-11,0228573	-2,09	0,18960601	0
YGL234W	ADE5,7	-8,64922358	-2,07075	0,239414553	0
YGL009C	LEU1	-7,36014978	-2,0255	0,275198204	0
YKR093W	PTR2	-7,68499561	-1,891	0,246063901	0
YKR080W	MTD1	-8,26024542	-1,8825	0,227898798	0
YHR137W	ARO9	-8,33308952	-1,8335	0,220026437	0
YCL064C	CHA1	-6,53158153	-1,7835	0,27305791	0
YKL120W	OAC1	-9,38228172	-1,76675	0,188307072	0
YDR408C	ADE8	-9,11415507	-1,74375	0,191323275	0
YMR300C	ADE4	-5,79135239	-1,637	0,28266282	0
YDR144C	MKC7	-7,05375462	-1,572	0,222860035	0
YNL065W	AQR1	-8,54810273	-1,52175	0,17802196	0
YHR208W	BAT1	-6,74707605	-1,51225	0,224134127	0
YJR015W		-6,37168128	-1,48425	0,232944797	0
YGR061C	ADE6	-6,14634662	-1,4265	0,232089091	0
YNL141W	AAH1	-6,8200915	-1,39975	0,205239182	0
YOR108W		-7,4915687	-1,37825	0,183973485	0
YCL030C	HIS4	-7,42988502	-1,37625	0,185231669	0
YDR537C		-5,02950378	-1,3679	0,271975141	0
YLL012W		-6,18372396	-1,34275	0,217142617	0
YJL200C		-6,3223232	-1,3205	0,208833368	0
YOR153W	PDR5	-6,1972853	-1,30975	0,211342537	0
YBR291C	CTP1	-7,58714596	-1,28875	0,169859656	0
YLL028W	TPO1	-6,51799788	-1,27475	0,195573859	0
YNR019W	ARE2	-6,47061078	-1,233225	0,190588654	0
YDR384C		-4,71121792	-1,2305	0,261185116	0
YML056C	IMD4	-5,44012893	-1,2275	0,225638034	0
YOR101W	RAS1	-6,35593814	-1,21275	0,190805822	0
YML043C	RRN11	-6,24866371	-1,207	0,193161299	0
YBL039C	URA7	-3,93308493	-1,19675	0,304277691	0
YBR069C	TAT1	-6,03042373	-1,18675	0,1967938	0
YELO30C-a		-6,10830382	-1,18575	0,194120992	0
YPR009W	SUT2	-3,9528274	-1,1835	0,299405939	0
YML073C	RPL6A	-4,61945472	-1,1785	0,25511669	0
YNR050C	LYS9	-4,39375744	-1,178	0,268107654	0
YAR073W	IMD1	-6,81860061	-1,16725	0,171186152	0
YELO40W	UTR2	-5,38472921	-1,167	0,21672399	0
YIL117C	PRM5	-5,03342057	-1,15175	0,228820537	0
YJL050W	MTR4	-5,20858957	-1,137225	0,218336458	0
YLR058C	SHM2	-4,73989049	-1,134	0,239246034	0
YML075C	HMG1	-6,89560932	-1,126	0,163292314	0
YGR060W	ERG25	-5,75429733	-1,11425	0,193637891	0
YGR266W		-4,8097375	-1,11225	0,231249626	0

YJL172W	CPS1	-2,97456772	-1,10275	0,370726137	0
YBR092C	PH03	-5,52158501	-1,09725	0,198720114	0
YBL098W	BNA4	-5,24233831	-1,09	0,207922483	0
YDL096C		-4,14725059	-1,08175	0,260835456	0
YDR509W		-3,73908443	-1,07875	0,288506457	0
YDR361C	BCP1	-4,46631088	-1,0605	0,237444286	0
YER039C-a		-6,03010545	-1,04425	0,173172759	0
YNL303W		-4,65626649	-1,044	0,224213971	0
YDR492W		-4,35782332	-1,04275	0,239282303	0
YER110C	KAP123	-4,67918097	-1,03725	0,22167341	0
YLR180W	SAM1	-5,20397464	-1,02725	0,197397196	0
YMR189W	GCV2	-5,20413904	-1,01925	0,195853722	0
YHR032W		-4,30017131	-1,01175	0,235281324	0
YBR066C	NRG2	-3,75136339	-1,00575	0,268102526	0
YAL044C	GCV3	-5,65301287	-1,00125	0,177117941	0
YKLO14C		-5,3441708	-1,001	0,187306888	0
YLR112W		-4,02438676	-0,99725	0,24780173	0
YOR141C	ARP8	-1,98495351	-0,994	0,500767395	0,0075547
YDR234W	LYS4	-4,31694958	-0,98475	0,228112463	0
YMR217W	GUA1	-3,4933937	-0,97525	0,279169794	0
YPL177C	CUP9	-5,01575358	-0,9745	0,194287854	0
YCR102C		-4,21164767	-0,972	0,230788536	0
YBL042C	FUI1	-5,30063873	-0,971	0,18318547	0
YHR216W	IMD2	-4,67750187	-0,971	0,207589441	0
YPR118W		-4,6329898	-0,96825	0,208990315	0
YLR432W	IMD3	-4,6787836	-0,96675	0,206624217	0
YKLO29C	MAE1	-4,15984432	-0,96025	0,230837966	0
YOR225W		-4,672231	-0,95925	0,20530877	0
YDR210W		-5,10625111	-0,958	0,187613178	0
YNL111C	CYB5	-5,77387205	-0,95275	0,165010584	0
YOR095C	RKI1	-3,87522686	-0,94825	0,244695352	0
YBR084W	MIS1	-4,91349571	-0,9435	0,192022148	0
YDR508C	GNP1	-3,83371906	-0,9425	0,245844827	0
YOL109W		-4,73157277	-0,94075	0,198823953	0
YKR092C	SRP40	-3,37485787	-0,94	0,278530249	0
YDR089W		-4,84821016	-0,9395	0,193782853	0
YML116W	ATR1	-4,05137843	-0,935	0,230785649	0
YDR380W	ARO10	-4,07365597	-0,9305	0,228418896	0
YER145C	FTR1	-4,30121516	-0,9285	0,215869229	0
YHR007C	ERG11	-4,719574	-0,9265	0,196310091	0
YILO94C	LYS12	-5,37569111	-0,926	0,172256921	0
YDR119W		-4,35247598	-0,9245	0,212407835	0
YDL063C		-3,86265949	-0,9245	0,239342868	0
YML125C		-4,50704873	-0,9215	0,204457519	0
YPL245W		-5,20081622	-0,92125	0,177135657	0
YLR333C	RPS25B	-2,50147684	-0,918	0,36698321	0
YJR048W	CYC1	-2,98526205	-0,91775	0,307426947	0
YLR413W		-4,06256692	-0,9175	0,225842434	0
YGR245C	SDA1	-3,20412056	-0,917	0,286193975	0
YDR256C	CTA1	-3,82134619	-0,916	0,239706102	0
YNL174W		-3,54002013	-0,9135	0,25804938	0
YPL018W	CTF19	-4,65336666	-0,913	0,196202033	0

YKL191W	DPH2	-4,60677204	-0,90825	0,197155404	0
YDR491C		-3,70801304	-0,90765	0,244780693	0
YNR043W	MVD1	-4,19137829	-0,90475	0,215859781	0
YER049W		-3,76165577	-0,89875	0,238924042	0
YCL023C		-3,67653086	-0,89575	0,243640006	0
YML126C	ERG13	-5,22780924	-0,89025	0,170291218	0
YMR102C		-2,90646858	-0,890225	0,306290942	0
YMR243C	ZRC1	-4,81081763	-0,888	0,184584008	0
YCRX14W		-3,86366546	-0,8835	0,228668866	0
YOR306C	MCH5	-4,60269947	-0,88075	0,191355096	0
YBR091C	MRS5	-4,28514131	-0,88025	0,20541913	0
YML118W	NGL3	-2,93557869	-0,88025	0,299855699	0
YPR198W	SGE1	-3,27397911	-0,87975	0,268709717	0
YHR128W	FUR1	-4,12147955	-0,8755	0,212423716	0
YLR463C		-4,75581554	-0,875	0,183985269	0
YCR049C		-3,80644479	-0,86075	0,226129643	0
YOL124C		-3,99335301	-0,8565	0,214481414	0
YIL145W	SFH5	-3,64369671	-0,85575	0,234857637	0
YOR004W		-3,36250386	-0,85325	0,253754356	0
YDL182W	LYS20	-3,62316131	-0,85125	0,234946757	0
YLR161W		-2,58248739	-0,8495	0,328946427	0
YKL081W	TEF4	-4,17475035	-0,849	0,203365454	0
YLR367W	RPS22B	-4,06123513	-0,846	0,208311012	0
YOL020W	TAT2	-3,92315761	-0,84475	0,215324003	0
YJR124C		-3,55234016	-0,843675	0,237498371	0
YER056C	FCY2	-4,26226318	-0,84275	0,197723595	0
YOL080C	REX4	-3,79140639	-0,84025	0,221619609	0
YHR170W	NMD3	-3,34633594	-0,84025	0,251095531	0
YNL162W	RPL42A	-2,77842375	-0,839	0,301969777	0
YNL268W	LYP1	-3,76334333	-0,8325	0,221212875	0
YGR159C	NSR1	-3,02914534	-0,8325	0,274829996	0
YPL042C	SSN3	-2,39543219	-0,82775	0,34555351	0
YGR145W		-2,92842009	-0,82725	0,282490208	0
YGR035C		-3,72956688	-0,8255	0,221339374	0
YGL077C	HNM1	-4,16745942	-0,82475	0,197902347	0
YCRX04W		-3,26947226	-0,822	0,251416723	0
YCR022C		-3,30030596	-0,8215	0,248916316	0
YOR270C	VPH1	-4,52523073	-0,821	0,181427213	0
YCR040W	MATALPHA1	-3,42021905	-0,81975	0,239677631	0
YHLO08C		-3,38069799	-0,81925	0,242331614	0
YDL148C	NOP14	-3,17093065	-0,81725	0,257731906	0
YCR034W	FEN1	-3,57609247	-0,8095	0,226364393	0
YAL023C	PMT2	-4,14058065	-0,80425	0,194236043	0
YNL182C		-3,74877345	-0,804	0,214470149	0
YPL058C	PDR12	-3,98911843	-0,8035	0,201422949	0
YMR238W	DFG5	-4,03462899	-0,802	0,19877912	0
YCRX16C		-4,68631465	-0,8005	0,170816528	0
YHR072W	ERG7	-4,30892271	-0,8	0,185661255	0
YHR197W		-3,87154326	-0,7995	0,206506797	0
YNL014W	HEF3	-4,43469125	-0,79925	0,180226752	0
YBL054W		-3,03014935	-0,79925	0,263765876	0
YPR065W	ROX1	-2,97178477	-0,797	0,268189005	0

YLR162W		-1,86380036	-0,797	0,427620907	0,0196658
YGR160W	FYV13	-2,54173747	-0,79675	0,313466678	0
YBR242W		-3,77914426	-0,79575	0,210563542	0
YEL053W-a		-3,6181366	-0,795	0,219726364	0
YNR015W	SMM1	-4,05201168	-0,79275	0,195643563	0
YOL092W		-3,7564261	-0,7925	0,210971807	0
YLR449W	FPR4	-3,19069139	-0,792	0,248222063	0
YDL095W	PMT1	-3,8168106	-0,789	0,206717095	0
YLR197W	SIK1	-3,34774346	-0,7885	0,235531787	0
YNL132W	KRE33	-3,42629618	-0,787	0,229694095	0
YGL016W	KAP122	-4,19518217	-0,782	0,186404301	0
YBL083C		-4,4746901	-0,78165	0,174682488	0
YMR075C-a		-3,78398151	-0,781	0,206396358	0
YOL101C		-2,34601712	-0,78025	0,332584955	0
YDR087C	RRP1	-3,96497059	-0,779	0,196470562	0
YLR012C		-1,95243258	-0,777	0,397965085	0,0075547
YCL037C	SR09	-2,2522856	-0,77375	0,343539913	0
YKL161C		-3,52728282	-0,77325	0,219219734	0
YLR061W	RPL22A	-4,32810646	-0,773	0,178600043	0
YILO96C		-2,95744206	-0,77175	0,260951858	0
YILO30C	SSM4	-3,12559319	-0,77125	0,246753161	0
YOR340C	RPA43	-3,67406383	-0,76975	0,209509153	0
YJR071W		-3,18764052	-0,76825	0,241008983	0
YGL027C	CWH41	-4,49756696	-0,7679	0,170736758	0
YKL073W	LHS1	-3,54172885	-0,76775	0,216772665	0
Mm100549		-3,21620832	-0,766725	0,238394073	0
YCRX06W		-3,22961471	-0,76425	0,236638135	0
YOR272W	YTM1	-3,75292394	-0,7605	0,202641997	0
YOR385W		-4,39044255	-0,76035	0,173182997	0
YCR064C		-3,09422687	-0,76	0,245618706	0
YPR190C	RPC82	-3,66985605	-0,75725	0,206343243	0
YEL048C		-3,80169267	-0,75625	0,198924549	0
YPL273W	SAM4	-4,22357836	-0,7545	0,178639991	0
YPL126W	NAN1	-4,01071223	-0,75425	0,188058868	0
YCR025C		-2,9718175	-0,754	0,253716792	0
YCL026C		-3,89664969	-0,753	0,193242929	0
YML026C	RPS18B	-3,16089076	-0,75275	0,238144895	0
YGL263W	COS12	-2,87307786	-0,75225	0,261827224	0
YCR099C		-2,98721111	-0,751	0,251405064	0
YDR398W	UTP5	-3,19180926	-0,7505	0,235133098	0
YNL112W	DBP2	-2,41073922	-0,75025	0,311211595	0
YPL093W	NOG1	-2,66632508	-0,7495	0,281098507	0
YMR202W	ERG2	-3,07501178	-0,74925	0,243657603	0
YCL045C		-2,83186868	-0,749	0,264489665	0
YPL207W		-4,19454935	-0,7485	0,178445868	0
YPL266W	DIM1	-4,32219045	-0,74775	0,173002557	0
YKR071C	DRE2	-3,58221025	-0,745	0,207972159	0
YJL213W		-3,5637177	-0,743	0,208490139	0
YLR076C		-3,62312594	-0,74275	0,205002534	0
YLR122C		-2,09447574	-0,74225	0,354384626	0,0075547
YDR045C	RPC11	-2,90999791	-0,74025	0,254381626	0
YER055C	HIS1	-3,44944846	-0,74	0,214527049	0

YMR288W	HSH155	-2,32786731	-0,738	0,31702838	0
YIL140W	AXL2	-3,67698445	-0,7375	0,200571966	0
YGR211W	ZPR1	-3,8395446	-0,73725	0,192014959	0
YMR321C		-4,36369099	-0,735	0,168435391	0
YCL003W		-3,1378823	-0,734	0,233915721	0
YGR123C	PPT1	-2,93508402	-0,73275	0,249652137	0
YLR344W	RPL26A	-3,32068319	-0,73125	0,220210709	0
YLR406C	RPL31B	-4,09636433	-0,7305	0,178328864	0
YMR131C	RRB1	-3,3561831	-0,72975	0,217434502	0
YNL042W	BOP3	-3,96907028	-0,72875	0,18360723	0
YDR321W	ASP1	-3,77106652	-0,728	0,193048835	0
YCLX02C		-3,15090338	-0,7275	0,230886166	0
YKL106W	AAT1	-3,75541131	-0,726825	0,193540718	0
YPL160W	CDC60	-4,21180928	-0,72675	0,172550548	0
YNL220W	ADE12	-3,89540209	-0,7265	0,186501928	0
YLR285W		-3,48243891	-0,726	0,208474583	0
YGR208W	SER2	-3,8274502	-0,72425	0,189225192	0
YEL059W		-2,9943554	-0,72325	0,241537795	0
YNL189W	SRP1	-2,52661981	-0,72025	0,285064653	0
YHR098C	SFB3	-4,15397444	-0,7195	0,173207614	0
YKR041W		-3,48184962	-0,719	0,206499441	0
YDR341C		-2,81024666	-0,718	0,255493587	0
YJR117W	STE24	-3,98957373	-0,71525	0,179279805	0
YDR039C	ENA2	-3,25827668	-0,715	0,219441155	0
YLR460C		-2,8561215	-0,715	0,25033949	0
YIL121C	RPE1	-3,71908738	-0,71425	0,192049804	0
YOR346W	REV1	-2,37256913	-0,714	0,300939598	0
YDR505C	PSP1	-3,37868816	-0,71375	0,211250629	0
YPR136C	FYV15	-3,17433043	-0,71325	0,224693054	0
YCR101C		-3,16207412	-0,713	0,22548491	0
YCR087W		-3,61341073	-0,71275	0,19725131	0
YNL230C	ELA1	-3,79726653	-0,7105	0,187108278	0
YIRO26C	YVH1	-3,25730219	-0,70975	0,217895042	0
YNRO66C		-3,78917322	-0,7095	0,187244013	0
YCRX05W		-3,54543431	-0,70925	0,200046014	0
YMR049C	ERB1	-2,47135952	-0,70925	0,286987787	0
YGR122W		-3,39681771	-0,7085	0,208577574	0
YNL120C		-3,19107411	-0,7085	0,222025555	0
YDR101C	ARX1	-3,21981761	-0,70775	0,219810587	0
YCRX03C		-3,78711605	-0,70505	0,186170688	0
YCLX04W		-2,65107865	-0,7045	0,26574089	0
YPL086C	ELP3	-3,13783441	-0,7025	0,22388052	0
YCR080W		-2,76850734	-0,7025	0,253746844	0
YNL117W	MLS1	-1,74721773	-0,7025	0,402067806	0,0196658
YAL059W	ECM1	-3,41810828	-0,701	0,2050842	0
YHR089C	GAR1	-2,85951128	-0,701	0,245146786	0
YNL301C	RPL18B	-3,06719257	-0,70075	0,228466255	0
YOR228C		-2,99681263	-0,70025	0,233664925	0

EXPERIMENTO MICROARRAYS WT vs. *hal4hal5* en YPD pH 4.5 (Fondo genético BY4741)

GENES INDUCIDOS

Gene ID	Gene name	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
YCL018W	LEU2	2,51618147	4,689	1,86353808	0
YGL121C	GPG1	1,60626823	2,66175	1,65710182	0
YGR043C	YGR043C	1,38155414	2,45575	1,77752715	0
YNL160W	YGP1	1,51657875	2,4425	1,61053291	0
YGL184C	STR3	1,31815797	2,34875	1,78184258	0
YLR142W	PUT1	1,27910759	2,151	1,68164118	0
YFLO14W	HSP12	1,17570606	2,131	1,81252786	0
YKL178C	STE3	1,1816783	2,02525	1,71387594	0
YGL166W	CUP2	1,08865696	1,86775	1,71564604	0
YOR289W	YOR289W	1,13760366	1,86675	1,64094936	0
YCL027C-a		1,0200989	1,77975	1,74468378	0
YBR054W	YRO2	1,02565114	1,778	1,73353291	0
YCLX10C		0,9884715	1,74675	1,76712226	0
YCR021C	HSP30	0,68215493	1,745	2,55806993	0
YMR173W-a		0,89882537	1,7415	1,93752875	0
YOL077W-A	ATP19	1,02002829	1,7165	1,68279646	0
YER150W	SPI1	0,79373736	1,6875	2,12601811	0
YMR256C	COX7	0,98330672	1,6515	1,67953698	0
YGL156W	AMS1	0,99609938	1,636	1,64240641	0
YJR078W	BNA2	0,98424084	1,62	1,64593861	0
YER081W	SER3	1,01222024	1,61	1,59056295	0
YPR167C	MET16	0,90050133	1,504	1,67018076	0
YJL166W	QCR8	0,885713	1,4845	1,67605081	0
YDR529C	QCR7	0,90125454	1,471	1,63216931	0
YDR216W	ADR1	0,89673623	1,43675	1,60219912	0
YOR065W	CYT1	0,87229624	1,4345	1,64451013	0
YPL271W	ATP15	0,83572627	1,4335	1,71527455	0
YNL274C	YNL274C	0,82044667	1,42025	1,73106924	0
YCR005C	CIT2	0,87918335	1,415	1,60944813	0
YNL015W	PBI2	0,813027	1,39425	1,71488769	0
YHR001W-A	QCR10	0,7926436	1,394	1,75867187	0
YHR055C	CUP1-2	0,81218336	1,3835	1,70343307	0
YDR178W	SDH4	0,80436212	1,38025	1,715956	0
YMR173W	DDR48	0,80736646	1,378	1,70678381	0
YJR137C	ECM17	0,81912593	1,35825	1,65816994	0
YOR120W	GCY1	0,76563817	1,3575	1,77303071	0
YHR053C	CUP1-1	0,77549906	1,34675	1,73662363	0
YLR042C	YLR042C	0,80205787	1,3395	1,67007899	0
YKR076W	ECM4	0,80902051	1,32875	1,64241819	0
YBL064C	PRX1	0,79354635	1,32025	1,66373395	0
YDL181W	INH1	0,82128838	1,31975	1,60692642	0
YMR316C-a		0,65724627	1,312	1,99620759	0,34207646
YML120C	NDI1	0,76904923	1,29925	1,68942372	0
YBL045C	COR1	0,79547973	1,299	1,63297686	0

YKLO16C	ATP7	0,77918104	1,28975	1,65526358	0
YFR030W	MET10	0,75830178	1,26225	1,66457475	0
YPL280W	HSP32	0,75160892	1,26225	1,67939732	0
YKLO43W	PHD1	0,78065216	1,262	1,61659708	0
YFLO15C		0,64489196	1,259	1,952265	0,34207646
YNLO72W	RNH35	0,75718184	1,2525	1,65416011	0
YOR247W	SRL1	0,7644104	1,25025	1,6355743	0
YML091C	RPM2	0,71365089	1,23925	1,73649332	0
YMR174C	PAI3	0,67976498	1,21835	1,79231062	0
YGL088W		0,65900166	1,21225	1,83952496	0,34207646
YKLO01C	MET14	0,71418089	1,19675	1,67569591	0
YKLO26C	GPX1	0,65771119	1,19675	1,81956765	0,34207646
YLR438W	CAR2	0,69187487	1,19375	1,72538423	0
YJRO10W	MET3	0,70168745	1,171	1,66883417	0
YDR543C		0,65767865	1,1595	1,76301906	0,34207646
YML128C	MSC1	0,61171457	1,14625	1,87383146	0,52125936
YER067W	YER067W	0,51362452	1,1445	2,22828148	1,09464466
YBLO78C	ATG8	0,68156307	1,13925	1,67152541	0
YMR251W-a	HOR7	0,61906995	1,13875	1,83945286	0,52125936
YGL187C	COX4	0,68934181	1,13125	1,64105816	0
YDR322C-A	TIM11	0,69991775	1,12275	1,60411706	0
YPL187W	MF(ALPHA)1	0,65302771	1,11213889	1,70305007	0,34207646
YJLO79C	PRY1	0,65514695	1,1105	1,69503955	0,34207646
YLR054C	OSW2	0,62256568	1,098	1,76366935	0,52125936
YFR053C	HXK1	0,6022101	1,09575	1,81954769	0,52125936
YJLO48C	YJLO48C	0,6435266	1,0795	1,67747532	0,34207646
YLR286C	CTS1	0,63134723	1,0755	1,7035	0,52125936
YDR296W	MHR1	0,6170576	1,07475	1,74173366	0,52125936
YDR377W	ATP17	0,62841394	1,068	1,69951672	0,52125936
YJRO73C	OPI3	0,61130447	1,063	1,73890434	0,52125936
YHR112C	YHR112C	0,64821594	1,05825	1,63255781	0,34207646
YLL041C	SDH2	0,60355918	1,057	1,75127814	0,52125936
YKL150W	MCR1	0,61150974	1,05375	1,72319414	0,52125936
YMR169C	ALD3	0,61107714	1,052	1,72155025	0,52125936
YBR067C	TIP1	0,5980803	1,04325	1,74433098	0,52125936
YBR039W	ATP3	0,6164736	1,0395	1,68620359	0,52125936
YJL217W	YJL217W	0,61324292	1,03775	1,69223315	0,52125936
YOR248W	TOS11	0,61782272	1,03175	1,66997742	0,52125936
YBLO99W	ATP1	0,60310797	1,0135	1,68046197	0,52125936
YBLO48W		0,59887155	1,0115	1,68900994	0,52125936
YKLO69W	YKLO69W	0,59837469	1,0095	1,68707001	0,52125936
YGL188C		0,59096857	1,00275	1,69679073	0,52125936
YHR087W	YHR087W	0,52378187	1,00025	1,90966901	0,84203436
YBR230C	YBR230C	0,59905867	0,99625	1,66302577	0,52125936
YJL161W	FMP33	0,55153359	0,98375	1,78366289	0,84203436
YJRO77C	MIR1	0,54762022	0,9825	1,7941266	0,84203436
YBLO15W	ACH1	0,57432833	0,98175	1,70938807	0,74634863
YML090W		0,54549791	0,9795	1,79560724	0,84203436
YNL332W	THI12	0,58294664	0,9715	1,66653331	0,52125936
YCL025C	AGP1	0,61030609	0,97075	1,5905953	0,52125936
YDR298C	ATP5	0,59098727	0,9565	1,61847819	0,52125936
YKLO85W	MDH1	0,56494344	0,95175	1,68468192	0,74634863

YKL044W		0,57871221	0,94075	1,62559212	0,74634863
YOL163W	YOL163W	0,56321217	0,936675	1,6630944	0,74634863
YLR395C	COX8	0,57422385	0,9315	1,62218968	0,74634863
YHR051W	COX6	0,56250799	0,93	1,65330984	0,74634863
YER158C	YER158C	0,54677321	0,92925	1,69951632	0,84203436
YDL004W	ATP16	0,55146134	0,9285	1,68370824	0,84203436
YMR199W	CLN1	0,55272854	0,9265	1,67622972	0,84203436
YNLO55C	POR1	0,57155442	0,9185	1,60702107	0,74634863
YOL106W		0,50093002	0,915	1,82660243	1,09464466
YDL014W	NOP1	0,55477015	0,91475	1,64888107	0,84203436
YPRO20W	ATP20	0,54690361	0,91125	1,66619853	0,84203436
YCRO20C-a	MAK31	0,55830375	0,91	1,62993711	0,74634863
YCL035C	GRX1	0,55345322	0,9095	1,64331866	0,84203436
YDR320C-a	DAD4	0,518964	0,90575	1,74530409	0,84203436
YGL191W	COX13	0,56442504	0,905	1,60340159	0,74634863
YER053C	YER053C	0,48129756	0,902	1,87410052	1,31095169
YIRO17C	MET28	0,56182694	0,895	1,59301723	0,74634863
YKL097W-A		0,50250742	0,89275	1,77659069	1,09464466
YDR218C	SPR28	0,54441261	0,884	1,62376842	0,84203436
YDR461W	MFA1	0,48303236	0,8815	1,8249295	1,31095169
YLR218C	YLR218C	0,50681154	0,87725	1,73091954	1,09464466
YGR138C	TPO2	0,4982073	0,876325	1,75895656	1,09464466
YLR307W	CDA1	0,53297868	0,8675	1,62764483	0,84203436
YJL016W	YJL016W	0,52082865	0,86325	1,6574549	0,84203436
YKRO69W	MET1	0,51646979	0,8595	1,66418253	0,84203436
YOL083W	YOL083W	0,53239615	0,85675	1,60923404	0,84203436
YGR161C	RTS3	0,45747388	0,85625	1,87169158	1,52033981
YBL030C	PET9	0,52832007	0,8555	1,61928355	0,84203436
YJR121W	ATP2	0,50728395	0,85525	1,6859394	1,09464466
YKL103C	LAP4	0,50441461	0,85525	1,69552979	1,09464466
YEL011W	GLC3	0,42804634	0,85125	1,98868653	2,07515576
YPL014W	YPL014W	0,45222877	0,848	1,87515711	1,52033981
YDL124W	YDL124W	0,50941398	0,84675	1,66220408	1,09464466
YEL060C	PRB1	0,48578084	0,84625	1,74204071	1,31095169
YPL078C	ATP4	0,52079386	0,84275	1,61820264	0,84203436
YDR055W	PST1	0,49165434	0,82825	1,68461851	1,09464466
YMR170C	ALD2	0,4860241	0,828	1,70361922	1,31095169
YLR294C		0,48827697	0,8265	1,69268685	1,31095169
YAL063C	FLO9	0,50908449	0,825	1,62055615	1,09464466
YAL065C	YAL065C	0,50423622	0,82375	1,63365893	1,09464466
YER124C	DSE1	0,50289507	0,82275	1,63602718	1,09464466
YOL150C		0,50160539	0,82175	1,63823997	1,09464466
YOL016C	CMK2	0,39777415	0,8205	2,06272832	2,36497303
YOR215C	YOR215C	0,50214434	0,8195	1,63200087	1,09464466
YER091C	MET6	0,48788376	0,81825	1,67714128	1,31095169
YDLO67C	COX9	0,47087095	0,817	1,7350826	1,52033981
YBL100C		0,46932868	0,817	1,74078429	1,52033981
YMR304C-A		0,50765968	0,81625	1,60786849	1,09464466
YDR058C	TGL2	0,50108529	0,81575	1,62796637	1,09464466
YJL151C	SNA3	0,49180888	0,81325	1,65358949	1,09464466
YML054C	CYB2	0,47886231	0,81	1,6915092	1,31095169
YLR092W	SUL2	0,49917233	0,80875	1,62018197	1,09464466

YNLO36W	NCE103	0,44874908	0,80775	1,80000371	1,84331355
YOL053C-a		0,43250024	0,806	1,86358278	2,07515576
YJRO25C	BNA1	0,48669341	0,8055	1,65504605	1,31095169
YOR121C		0,46663566	0,8045	1,7240431	1,52033981
YCL040W	GLK1	0,45339464	0,802	1,76887844	1,52033981
YPR151C	SUE1	0,47431158	0,8005	1,68770918	1,31095169
YHR092C	HXT4	0,45329891	0,7975	1,75932475	1,52033981
YILO15C-A		0,49097215	0,79725	1,62381919	1,31095169
YNLO52W	COX5A	0,47273761	0,7965	1,68486701	1,31095169
YDR530C	APA2	0,48574572	0,79	1,62636534	1,31095169
YGR142W	BTN2	0,34581114	0,79	2,28448393	3,68884956
YJR120W	YJR120W	0,45263931	0,7885	1,74200513	1,52033981
YLR121C	YPS3	0,46156012	0,78	1,6899207	1,52033981
YMR081C	ISF1	0,36402545	0,77725	2,13515291	3,15406089
YPRO15C	YPRO15C	0,46459083	0,7759	1,6700717	1,52033981
YER159C	BUR6	0,43885399	0,76675	1,74716423	1,84331355
YPR191W	QCR2	0,44343877	0,766	1,72740873	1,84331355
YML131W	YML131W	0,47052517	0,76325	1,62212363	1,52033981
YNLO03C	PET8	0,47279822	0,76025	1,60797983	1,31095169
YPL111W	CAR1	0,46950481	0,7545	1,6070123	1,52033981
YOR222W	ODC2	0,44104521	0,754	1,70957531	1,84331355
YLR038C	COX12	0,46753181	0,75216667	1,60880317	1,52033981
YER163C	YER163C	0,47185757	0,7505	1,59052232	1,31095169
YDR340W		0,45872787	0,7495	1,63386628	1,52033981
YOR385W	YOR385W	0,39447589	0,74825	1,89682063	2,36497303
YDR379C-a	YDR379C-A	0,43848072	0,74625	1,70189924	1,84331355
YMR105C	PGM2	0,37539073	0,741	1,97394323	3,15406089
YOR032C	HMS1	0,4570503	0,73666667	1,61178467	1,52033981
YER057C	HMF1	0,44238553	0,736	1,66370722	1,84331355
YKL160W	ELF1	0,44636935	0,734	1,64437812	1,84331355
YFLO12W	YFLO12W	0,39024986	0,7305	1,87187767	2,81710023
YOR009W	TIR4	0,39077126	0,728	1,86298244	2,81710023
YKL148C	SDH1	0,43919232	0,725	1,65075746	1,84331355
YHR071W	PCL5	0,42457436	0,72275	1,70229309	2,07515576
YJL159W	HSP150	0,43370719	0,72225	1,66529404	1,84331355
YBR225C-a		0,42693154	0,71925	1,68469633	2,07515576
YILO60W	YILO60W	0,39078685	0,71775	1,836679	2,81710023
YPRO98C	YPRO98C	0,41555736	0,713	1,71576796	2,07515576
YBR090C	YBR090C	0,44732172	0,7125	1,59281333	1,84331355
YGR279C	SCW4	0,44130187	0,709	1,60661001	1,84331355
YBR158W	AMN1	0,43829837	0,7085	1,61647874	1,84331355
YGR008C	STF2	0,40055065	0,70775	1,76694257	2,36497303
YBL049W	MOH1	0,41032651	0,7015	1,70961413	2,36497303
YOL143C	RIB4	0,42271438	0,7005	1,65714733	2,07515576
YEL024W	RIP1	0,40837411	0,7005	1,71533892	2,36497303
YOR391C	HSP33	0,4404784	0,70025	1,58974878	1,84331355

GENES REPRIMIDOS

Gene ID	Gene name	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
YEL065W	SIT1	-1,25386091	-2,51025	2,00201632	0
YHR137W	ARO9	-1,33676363	-2,26	1,69065042	0
YNL065W	AQR1	-1,17885977	-2,03075	1,72263916	0
YOR153W	PDR5	-1,22937961	-2,0015	1,62805694	0
YBR068C	BAP2	-1,13276814	-1,92275	1,6973906	0
YGL009C	LEU1	-1,02585257	-1,73	1,68640216	0
YMR189W	GCV2	-0,96588024	-1,56125	1,61640122	0
YBR244W	GPX2	-0,94119109	-1,53025	1,62586538	0
YLL028W	TPO1	-0,89671501	-1,51925	1,69423952	0
YAR073W	IMD1	-0,93341481	-1,51825	1,62655444	0
YCL064C	CHA1	-0,87094275	-1,4395	1,65280668	0
YER145C	FTR1	-0,82219842	-1,4235	1,73133391	0
YCL030C	HIS4	-0,80217091	-1,311	1,63431506	0
YNL279W	PRM1	-0,74676322	-1,259	1,6859427	0,52125936
YLR432W	IMD3	-0,78257105	-1,25775	1,60720231	0,34207646
YHR208W	BAT1	-0,75152761	-1,223	1,62735206	0,52125936
YHR216W	IMD2	-0,72590788	-1,19325	1,64380363	0,52125936
YCR089W	FIG2	-0,69997831	-1,18175	1,6882666	0,86192493
YCL037C	SRO9	-0,65631944	-1,162	1,77047931	1,09464466
YKL120W	OAC1	-0,6468684	-1,1055	1,70900295	1,09464466
YOL058W	ARG1	-0,6395406	-1,05975	1,65704883	1,31095169
YDL241W	YDL241W	-0,62834116	-1,058	1,68379866	1,31095169
YML056C	IMD4	-0,62974588	-1,02075	1,62089191	1,31095169
YLR355C	ILV5	-0,59957965	-1,012	1,68784915	1,84331355
YOR225W		-0,58157152	-0,98	1,6850894	2,07515576
YLR332W	MID2	-0,583409	-0,976	1,67292586	2,07515576
YMR058W	FET3	-0,52377038	-0,9655	1,84336501	2,81710023
YKL106W	AAT1	-0,58360787	-0,96125	1,64708197	2,07515576
YDL037C	BSC1	-0,55245992	-0,93475	1,69197794	2,36497303
YOR108W	LEU9	-0,57786294	-0,934	1,61630023	2,07515576
YLR112W		-0,55033087	-0,9315	1,6926181	2,36497303
YEL038W	UTR4	-0,53185627	-0,92125	1,7321409	2,36497303
YLL012W	YLL012W	-0,57190603	-0,91666667	1,6028272	2,07515576
YGR234W	YHB1	-0,54887916	-0,9115	1,66065697	2,36497303
YLR413W	YLR413W	-0,54995071	-0,90925	1,65332998	2,36497303
YBR286W	APE3	-0,54657414	-0,9025	1,6511941	2,36497303
YCR008W	SAT4	-0,54172001	-0,88141667	1,62707054	2,36497303
YKR080W	MTD1	-0,54292388	-0,8795	1,61993242	2,36497303
YLR359W	ADE13	-0,52574018	-0,85775	1,63150932	2,81710023
YOR011W	AUS1	-0,49324119	-0,8565	1,73647298	3,68884956
YGR266W	YGR266W	-0,5146858	-0,84725	1,64614995	2,81710023
YCRX18C		-0,51773886	-0,84125	1,62485389	2,81710023
YIL121W	QDR2	-0,50217685	-0,8405	1,67371315	3,15406089
YDR384C	ATO3	-0,47649436	-0,81925	1,71932779	4,50829087
YBR069C	TAT1	-0,46119842	-0,79	1,71292867	4,50829087
YDR011W	SNQ2	-0,47755953	-0,78775	1,64953256	4,50829087
YGL077C	HNM1	-0,43293532	-0,78175	1,80569697	5,28118038
YMR120C	ADE17	-0,45951289	-0,77125	1,67840774	4,50829087

YKR050W	TRK2	-0,45172407	-0,77025	1,70513383	4,50829087
YCR102C	YCR102C	-0,44111033	-0,76375	1,73142622	5,28118038
YDL182W	LYS20	-0,47023477	-0,762	1,62046716	4,50829087
YILO82W		-0,446777	-0,75925	1,69939366	5,28118038
YPL177C	CUP9	-0,46451799	-0,75375	1,62264973	4,50829087
YPR009W	SUT2	-0,43645222	-0,748	1,71381877	5,28118038
YER073W	ALD5	-0,42963286	-0,7375	1,71658194	5,28118038
YHR032W	YHR032W	-0,4571543	-0,731325	1,59973339	4,50829087
YLR058C	SHM2	-0,44369489	-0,7275	1,63964026	5,28118038
YAR015W	ADE1	-0,43025443	-0,72275	1,67982001	5,28118038
YIR030C	DCG1	-0,42503923	-0,72225	1,6992549	5,28118038
YJR015W	YJR015W	-0,44584614	-0,71825	1,61098176	5,28118038
YML126C	ERG13	-0,44376023	-0,71375	1,60841362	5,28118038
YJR016C	ILV3	-0,44701475	-0,71325	1,59558493	5,28118038
YGR281W	YOR1	-0,43961219	-0,7095	1,61392248	5,28118038
YHR207C	SET5	-0,4368638	-0,704	1,61148623	5,28118038
YGL234W	ADE5,7	-0,42883746	-0,70025	1,63290306	5,28118038
YMR323W	YMR323W	-0,42626824	-0,7	1,64215849	5,28118038

En estas tablas:

- **Gene ID:** referencia del gen.
- **Gene name:** nombre del gen.
- **Score (d):** Estadístico calculado por SAM (Tusher *et al*, 2001), según la fórmula:

$$\text{Score (d): Numerator (r) / Denominador (s+s}_0\text{)}$$

- **Numerator (r):** En los análisis tipo *one class*, el numerador se corresponde con el valor de cambio o *fold-change* (logaritmo en base 2).
- **q-value (%):** Probabilidad de que el gen haya sido seleccionado por error.