

Vicent Llopis Torregrosa

Mecanismos de regulación de transportadores de iones y nutrientes a través de proteínas de tráfico relacionadas con las arrestinas.





UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Diciembre 2015

Programa de Doctorado en Biotecnología

Mecanismos de regulación de transportadores de iones y
nutrientes a través de proteínas de tráfico
relacionadas con las arrestinas.

Autor

Vicent Llopis Torregrosa

Directora

Lynne Yenush

Esta tesis doctoral ha sido financiada por la
Universitat Politècnica de València
(programa FPI-UPV) y por
el Ministerio de Ciencia e Innovación,
Madrid (BFU2008-04188-C03-02 y
BFU2011-30197-C03-03).



Proyecto Gráfico: Paolo Privitera
(p.privitera@gmail.com)



Resum

Qualsevol cèl·lula viva necessita mantindre nivells adequats d'ions i nutrients per tal d'assegurar la continuïtat de les seues funcions. El primer pas en la conservació de l'homeòstasi d'ions com el potassi o nutrients com la glucosa, és la pressa dels mateixos des del medi extern, tot i tenint els transportadors de membrana un paper bàsic en este procés. De manera directa, la regulació d'aquests transportadors té una funció fonamental en la resposta de les cèl·lules a diferents condicions ambientals, tot i sent processos essencials tant la modulació de la seua activitat com l'abundància de permeases a la membrana plasmàtica. Per això, entendre les rutes que regulen la funció o la presència dels transportadors a la membrana és important per a un millor coneixement de la fisiologia cel·lular i la resposta a l'estrés. La regulació transcripcional suposa un nivell important en el control de l'abundància de transportadors a la membrana plasmàtica, i més concretament en el rent model *Saccharomyces cerevisiae* s'ha demostrat que les permeases d'hexoses tenen una forta regulació a nivell transcripcional. A banda d'aquest tipus de regulació, existeixen altres nivells importants per al control i el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa, com la regulació postraduccional, i , que en el cas dels transportadors de glucosa, és menys coneguda. L'ubiquitinació com a senyal per a l'endocitosi de proteïnes de membrana a través de l'E3 ubiquitina ligasa Rsp5, ha sigut demostrada per a un gran nombre de transportadors, inclosos els de la família HXT. En els últims anys, diversos estudis han posat de manifest la implicació de la família de proteïnes ART (Arrestin Related Trafficking proteins) en este procés, tot i actuant com adaptadores de Rsp5 i aportant especificitat a l'ubiquitinació de transportadors en resposta a canvis en les condicions del medi. Al mateix temps, aquesta família de proteïnes és diana de modificacions postraduccional, com l'ubiquitinació o la fosforilació, que tenen un efecte en la seua activitat i

sumen un nivell addicional a la regulació dels transportadors amb els quals interaccionen. Estudis anteriors demostraren l'existència d'una interacció genètica entre el transportador de glucosa d'alta afinitat Hxt6 i la proteïna adaptadora de Rsp5, Rod1 (Art4). De la mateixa manera, la quinasa Snf1 va ser involucrada en la fosforilació d'aquesta proteïna adaptadora, tot i suggerint una possible funció en la regulació de la seua activitat. Amb estos precedents, i tenint en compte la interacció de les proteïnes 14-3-3 amb altres proteïnes adaptadores, en el present estudi es durà a terme la caracterització bioquímica de la ruta de senyalització Art4-Snf1-14-3-3 implicada en la regulació per endocitosi del transportador de glucosa Hxt6, i s'estudiarà l'efecte de Snf1 i les proteïnes 14-3-3 (Bmh2) sobre el tràfic intracel·lular del complex Hxt6-Art4. Per altra banda, s'analitzarà l'efecte de Art4, i del seu paràleg Rog3 (Art7), sobre els nivells de Hxt6 i es caracteritzaran els fenotips de mutants per a altres transportadors de glucosa, tals com Hxt1 i Hxt3, per la possibilitat que presenten un mecanisme regulador comú que també implique a Art4 i Art7. En definitiva, la present tesi doctoral pretén aportar noves dades al voltant de la regulació postraduccional dels transportadors de la família HXT a través de les proteïnes ART, adaptadores de Rsp5, tot i aprofundint en aspectes bioquímics com la fosforilació i l'ubiquitinació, i en aspectes moleculars i cel·lulars, com el tràfic intracel·lular o l'estabilitat de permeases.



Resumen

Cualquier célula viva necesita mantener niveles adecuados de iones y nutrientes para asegurar la continuidad de sus funciones. El primer paso en la conservación de la homeostasis de iones como el potasio o nutrientes como la glucosa, es la toma de los mismos desde el medio externo, teniendo los transportadores de membrana un papel básico en este proceso. La regulación de estos transportadores tiene una función fundamental en la respuesta de las células a diferentes condiciones ambientales, siendo esenciales tanto la modulación de su actividad como la abundancia de permeasas en la membrana plasmática. Por esto, el estudio de las rutas que regulan la función o la presencia de dichos transportadores en la membrana plasmática es importante para un mejor conocimiento de la fisiología celular y la respuesta de las células al estrés. La regulación transcripcional supone un nivel importante en el control de la abundancia de transportadores en la membrana plasmática, y más concretamente en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que los transportadores de hexosas poseen una fuerte regulación a nivel transcripcional. Sin embargo, existen otros niveles importantes para el control y el mantenimiento de la homeostasis de hexosas, como la regulación postraduccional, y que en el caso de los transportadores de glucosa es menos conocida. La ubiquitinación como señal para la endocitosis de proteínas de membrana a través de la E3 ubiquitín ligasa Rsp5 ha sido demostrada para gran número de transportadores, incluidos los de la familia HXT. En los últimos años, varios estudios han demostrado la implicación de la familia de proteínas ART (Arrestin Related Trafficking proteins) en este proceso, actuando como adaptadores de Rsp5 y aportando especificidad a la ubiquitinación de transportadores en respuesta a cambios en las condiciones del medio. A su vez, esta familia de proteínas adaptadoras es diana de modificaciones postraduccionales, como la

ubiquitinación o la fosforilación, que repercuten en su actividad y suman un nivel adicional en la regulación de los transportadores con los que interaccionan. Estudios anteriores demostraron la existencia de una interacción genética entre el transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 y la proteína adaptadora de Rsp5, Rod1 (Art4). A su vez, la quinasa Snf1 fue implicada en la fosforilación de esta proteína adaptadora, sugiriendo una posible función en la regulación de su actividad. Con estos precedentes, y teniendo en consideración la interacción de las proteínas 14-3-3 con otras proteínas adaptadoras, en el presente estudio se llevará a cabo la caracterización bioquímica de la ruta de señalización Art4-Snf1-14-3-3 implicada en la regulación por endocitosis del transportador de glucosa Hxt6 y se estudiará el efecto de Snf1 y las proteínas 14-3-3 (Bmh2) sobre el tráfico intracelular del complejo Hxt6-Art4. Del mismo modo, se analizará el efecto de Art4, y de su parálogo Rog3 (Art7), sobre los niveles de Hxt6 y se caracterizarán los fenotipos de mutantes para otros transportadores de glucosa, como Hxt1 y Hxt3, por la posibilidad de que presenten un mecanismo regulador común que implique también a Art4 y Art7. En definitiva, la presente tesis doctoral pretende aportar nuevos datos acerca de la regulación postraduccional de transportadores de la familia HXT a través de las proteínas ART, adaptadoras de Rsp5, haciendo hincapié en aspectos bioquímicos como la fosforilación y la ubiquitinación, y en aspectos moleculares y celulares, como el tráfico intracelular o la estabilidad de permeasas.



Abstract

Any living cell needs to maintain adequate levels of nutrients and ions to ensure the continuity of its functions. The first step in the maintenance of both ion and nutrient homeostasis is their uptake from the external environment, where plasma membrane transporter proteins play an important role. The regulation of both the activity and abundance of permeases in the plasma membrane is a pivotal aspect of the cellular response to different environmental conditions. Therefore, deciphering the pathways that regulate the function or the presence of these transport proteins is important for a better understanding of cell physiology and stress responses. Transcriptional regulation is a contributor to the control of the abundance of plasma membrane transporters, and more specifically in the yeast model *Saccharomyces cerevisiae* a strong transcriptional regulation of the hexose transporters has been demonstrated. However, there are other important levels for the control and maintenance of glucose homeostasis, such as post-translational regulation of glucose transporters, which are still being defined. Ubiquitination, as a signal for endocytosis of membrane proteins, mediated by the E3 ubiquitin ligase Rsp5 has been demonstrated for many transporters, including the HXT family. In recent years, several studies have shown the involvement of the ART protein family (Arrestin-Related Trafficking proteins) in this process, acting as adapters for Rsp5 and providing specificity to the ubiquitination of permeases in response to changes in environmental conditions. In turn, the members of this family of adapter proteins are targets of post-translational modifications, such as phosphorylation or ubiquitination, affecting their activity and adding an additional level in the regulation of transporter interactions. Previous studies have demonstrated the existence of a genetic interaction between the high affinity glucose transporter Hxt6 and the Rsp5 adapter protein, Rod1 (Art4). In turn, the Snf1 kinase was shown

to be involved in the phosphorylation of this adapter protein, suggesting a possible role in the regulation of its activity. With this background, and taking into consideration the interaction of 14-3-3 proteins with other adapter proteins, in this study the biochemical characterization of the Art4-Snf1-14-3-3 signaling pathway involved in the regulation of the endocytosis of the glucose transporter Hxt6 and the effect of Snf1 and 14-3-3 proteins (Bmh2) on intracellular traffic of the Hxt6-Art4 complex will be investigated. Similarly, the effect of Art4, and its paralogue Rog3 (Art7), on Hxt6 levels and the phenotypes of other glucose transporter mutants, such as *hxt1* and *hxt3* will be analyzed to determine whether these transporters display a common regulatory mechanism also involving Art4 and Art7. In short, this thesis aims to provide new data on the post-translational regulation of the HXT transporters through the Rsp5 adapter family of ART proteins, with emphasis on biochemical aspects, such as phosphorylation, and molecular and cellular aspects, such as intracellular trafficking and permease stability.



Abreviaturas

2-DG	2-desoxi-D-glucosa
AMPK	<i>AMP activated kinase</i> (proteína quinasa activada por AMP)
ART	Arrestin Related Trafficking adaptors (Adaptadores del tráfico relacionados con arrestinas)
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> (complementación de fluorescencia bimolecular)
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
DSP	<i>(dithiobis(succinimidyl propionate))</i> Reactivo de Lomant
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (quimioluminiscencia mejorada)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i> (Complejo de clasificación vacuolar requerido para el transporte)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
HA	Hemagglutinina
HECT	Homologous to E6-AP C Terminus
IPP	Interacción proteína-proteína

Kan	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
MAST	<i>Motif Alignment and Search Tool</i> (herramienta de alineamiento y búsqueda de motivos)
MES	<i>2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid</i> (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico)
MVB	<i>Multivesicular body</i> (Cuerpo multivesicular)
ONPG	<i>Ortho-Nitrophenyl-b-D-GalactoPyranoside</i> (ortho-nitrofenil-b-D-galactopiranosida)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (trama de lectura abierta)
PEG	Polietilenglicol
RING	Really Interesting New Gene (Gen nuevo realmente interesante)
SCD	Synthetic Complete Drop-out (medio mínimo completo)
SD	Medio mínimo sintético
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 Saccharomyces)
SSC	Sodium Saline Citrate (citrato salino sódico)
TBS	<i>Tris-Buffered-Salin</i> (tampón salino ajustado con tris)
TMED	N, N, N',N'-tetrametiletilendiamina
V5	Epítipo del paramyxovirus SV5
YPD	Medio rico <i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>



Índice

Introducción

1. La membrana plasmática: Importancia biológica	19
1.1. Proteínas de transporte de la membrana plasmática	20
1.2. Transportadores de iones en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.2.1. Pma1, la bomba de protones esencial	22
1.2.2. Trk1 y Trk2, el sistema de transporte de potasio de alta afinidad	22
1.3. Transportadores de azúcares en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.3.1. La familia HXT, transportando glucosa al interior de la célula	24
2. Regulación de la expresión de transportadores de membrana a nivel transcripcional	27
2.1. Regulación transcripcional de PMA1	27
2.2. Regulación transcripcional de TRK1 y TRK2	28
2.3. Regulación transcripcional de transportadores de hexosas	29
3. Regulación postraduccional de transportadores de membrana	34
3.1. Fosforilación	34
3.2. Ubiquitinación	37
3.2.1. Funciones y topología de la ubiquitinación	38
3.3. Ubiquitinación de transportadores de membrana	40
3.4. Las E3 ubiquitina ligasas	41
3.5. Rsp5: estructura, función y dianas	42
3.5.1. Estructura	42
3.5.2. Función	44
4. Adaptadores del Tráfico Relacionados con Arrestinas: la familia ART	48
4.1. Características de la familia ART	50
4.2. Funciones de la familia ART	51
4.3. Regulación de la actividad de las proteínas ART	53
4.3.1. Características de la quinasa Snf1	54
4.3.2. Características de las proteínas 14-3-3	55

Objetivos	57
Materiales y métodos	59
1. Material biológico y condiciones de crecimiento	59
1.1. Condiciones de crecimiento de levadura	60
1.1.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos)	60
1.1.2. Crecimiento en medio líquido	60
1.2. Condiciones de crecimiento de bacterias	60
2. Técnicas de transferencia génica	64
2.1. Transformación simple en levadura	64
2.2. Transformación de alta eficiencia	64
2.3. Transformación en bacteria	64
3. Técnicas de manipulación genética	65
3.1. Construcción de plásmidos	65
3.2. Disrupción Génica	68
3.3. Marcaje de genes con <i>GFP</i>	69
4. Análisis de proteínas	70
4.1. Obtención de extractos proteicos de célula completa (extractos crudos)	70
4.2. Obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble	70
4.3. Electroforesis de proteínas	70
4.4. Transferencia a membrana (<i>Western blot</i>)	71
4.5. Tinción de membranas con Direct Blue	71
4.6. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana	71
5. Co-inmunoprecipitación	73
6. Ensayo de doble híbrido en levadura	74
7. Ensayo β-galactosidasa (ensayo cuantitativo en líquido)	75
8. Análisis Northern blot	76
9. BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)	77
10. Cuantificación de la señal de GFP	78

Resultados

Capítulo 1

Regulación postraduccional de transportadores de iones	81
1. Estudio de la regulación por ubiquitinación del transportador de potasio Trk1	81
1.1. Ubiquitinación de Trk1	82
1.2. Rastreo de doble híbrido para la identificación de proteínas que interaccionen con Trk1	84
2. Estudio de los niveles de activación de Pma1 en respuesta a ayuno de potasio como confirmación a la predicción de un modelo matemático	86

Capítulo 2.

Regulación de transportadores de glucosa a través de la familia de proteínas ART	87
1. Caracterización bioquímica de la ruta de señalización Snf1 - Art4 - 14-3-3	87
1.1 Estudio de la interacción de la familia ART con la proteína quinasa Snf1	87
1.2. Mapeo de la interacción entre Art4 y Snf1	89
1.3. Estudio de la interacción de la familia ART con la proteína Bmh2 (14-3-3)	90
1.4. Papel de Snf1 en la interacción entre Bmh2 y Art4	92
1.5. Mapeo de la interacción entre Art4 y Bmh2	94
2. Papel del complejo Snf1-Art4-14-3-3 en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6	96
2.1 Interacción física entre Art4-Hxt6. Abordaje Split-Trp	96
2.2. Interacción Hxt6-Art4 y función de Snf1 y Bmh2. Coinmunoprecipitación	97
2.3. Interacción entre Hxt6-Art4 y función de Snf1 y Bmh2. BiFC	99
2.3.1. Cuantificación de la señal de interacción Hxt6-Art4	102
2.4. Análisis del papel de Snf1 y Bmh2 en la regulación de Hxt6 en respuesta a cambios en la fuente de carbono	105
2.5. Implicación de Art4 y Art7 en la endocitosis de Hxt6	106
2.6. Implicación de Art4 y Art7 en la acumulación de Hxt6	107
2.7. Análisis de los niveles de ARNm de Hxt6 en la cepa silvestre y <i>art4</i>	110
2.8. Acumulación de Art4 en respuesta a cambios en la fuente de carbono	112
2.9. Estudio de la toxicidad de la 2-deoxy-glucosa en mutantes <i>art4</i> y <i>art7</i>	113
2.10. Estudio de la implicación de Art4 y Art7 en la regulación de otros transportadores de la familia HXT	114
2.11. Análisis de la acumulación de Hxt1, Hxt3 y Snf3 en mutantes <i>art4</i> y <i>art7</i>	115

Discusión	117
Conclusiones	133
Anexos	135
Anexo 1. Mejora del sistema Split-Trp: una plataforma versátil para la detección de interacciones proteína-proteína	137
Anexo 2. Publicación: Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis revealed by mathematical modeling	147
Bibliografía	161



Índice de figuras y tablas

Introducción:

Figura 1. Principales transportadores de cationes en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 2. Modelo simplificado de la ruta de inducción por glucosa de los genes <i>HXT</i>	29
Figura 3. Diagrama de la ruta de transducción por glucosa responsable de la inducción de los genes <i>HXT</i>	30
Figura 4. Modelo de de la ruta de represión por glucosa responsable de la represión de los genes <i>HXT</i>	31
Figura 5. Modelo de la principal ruta de represión por glucosa	32
Figura 6. Rutas <i>Snf1</i> y <i>Rgt</i>	33
Figura 7. Estructura terciaria de la ubiquitina	37
Figura 8. Ubiquitinación de proteínas	38
Figura 9. Bases estructurales de la formación de cadenas K48 y K63 de ubiquitina	39
Figura 10. Pasos de la ruta biosintética y endocítica	40
Figura 11. E3 ubiquitina ligasas HECT y RING	42
Figura 12. Relación filogenética entre <i>Nedd4</i> , <i>Nedd4-2</i> y <i>Rsp5</i>	43
Figura 13. Interacción entre <i>Rsp5</i> y Ubiquitina	44
Figura 14. Esquema del tráfico intracelular de proteínas	45
Figura 15. Miembros de la familia ART	50
Figura 16. Ubiquitinación de proteínas de membrana mediante ARTs	51
Figura 17. Estructura de un dímero de proteínas 14-3-3	55
Tabla 1. Características de los transportadores de hexosas	25
Tabla 2. Permeasas y sus vías de regulación	45
Tabla 3. Nomenclatura de los componentes de la familia ART	49
Tabla 4. Permeasas de levadura y proteínas adaptadoras de <i>Rsp5</i> que regulan su endocitosis	52

Materiales y métodos:

Tabla 5. Cepas de levadura utilizadas en este estudio	61
Tabla 6. Plásmidos utilizados en este estudio	65
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	67
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para el marcaje de genes con GFP	69
Tabla 9. Anticuerpos utilizados en este trabajo	72

Resultados

Figura 18. <i>Western blot</i> de la inmunoprecipitación de Trk1	83
Figura 19. Las proteínas Art4 y Art7 interactúan físicamente con la quinasa Snf1	88
Figura 20. Análisis <i>Western blot</i> en el que se muestra la expresión de las proteínas Art y la quinasa Snf1	88
Figura 21. El dominio regulador (RD) de Snf1 y el extremo N-terminal de Art4 son los responsables de la interacción entre ambas proteínas	89
Figura 22. Análisis <i>Western blot</i> en el que se muestra la correcta expresión de los diferentes dominios de las proteínas Snf1 y Art4	90
Figura 23. La proteína Bmh2 interactúa con gran parte de los miembros de la familia ART	91
Figura 24. Análisis <i>Western blot</i> en el que se muestra la correcta expresión de la proteína Bmh2 y los diferentes componentes de la familia ART	91
Figura 25. La quinasa Snf1 favorece la interacción entre Art4 y Bmh2	92
Figura 26. Análisis <i>Western blot</i> para la comprobación de la expresión de Bmh2, Art4 y las variantes de Snf1	93
Figura 27. Cuantificación de la interacción entre Bmh2 y Art4 mediante ensayo β -galactosidasa	93
Figura 28. Cuantificación de la interacción entre Bmh2 y diferentes mutantes de Art4 mediante ensayo β -galactosidasa	94
Figura 29. Art4 interactúa con Bmh2 a través de su extremo N-terminal	95
Figura 30. Ensayo Split-Trp para la detección de la interacción física Hxt6-Art4	97
Figura 31. Interacción entre Hxt6-Art4 en ausencia y presencia de glucosa	98
Figura 32. Interacción de Hxt6 y Art4 mediante la técnica BiFC	100
Figura 33. La sobreexpresión de Snf1 (A) y Bmh2 (B) tienen un efecto sobre la interacción Hxt6-Art4	101

Figura 34. Cuantificación de la señal BiFC en la cepa <i>HXT6:VC-ART4:VN</i>	103
Figura 35. Cuantificación de la señal en la cepa <i>HXT6:VC-ART4:VN pWS93-SNF1</i>	104
Figura 36. Cuantificación de la señal en la cepa <i>HXT6:VC-ART4:VN pACT2-BMH2</i>	104
Figure 37. Snf1 y Bmh2 tienen un efecto sobre la degradación de Hxt6 en respuesta a glucosa	105
Figura 38. Art4 y Art7 están implicadas en el mecanismo de endocitosis de Hxt6-GFP	107
Figura 39. Art4 y Art7 tienen un efecto sobre la acumulación de Hxt6-GFP en diferentes condiciones de crecimiento	108
Figura 40. Art4 y Art7 tienen un efecto sobre la acumulación de Hxt6-GFP en medio MYRaf	109
Figura 41. La cepa <i>art4</i> presenta niveles alterados de mRNA y proteína correspondientes a <i>HXT6-GFP</i>	111
Figura 42. Art4 es fosforilado e incrementa su estabilidad cuando las células son crecidas en glucosa	112
Figura 43. Análisis de la tolerancia a 2-deoxy-glucosa de los mutantes <i>art4</i> y <i>art7</i>	114
Figura 44. Miembros de la familia HXT que presentan tolerancia a 2-DG	115
Figura 45. Art4 y Art7 no tienen efectos sobre la acumulación de Hxt1 y Hxt3	115
Tabla 10. Peso molecular de las proteínas de la familia ART	89

Discusión

Figura 46. Modelo de la interacción entre Art4, Snf1 y las proteínas 14-3-3	121
Figura 47. Modelo de la llegada de Hxt6 a la membrana y posterior endocitosis	131

Anexos

Figura A1.1. Modelo del sistema Split-Trp	138
Figura A1.2. Nuevos vectores obtenidos para el sistema Split-Trp	140
Figura A1.3. Goteos para el análisis de las interacciones Split-Trp	143
Tabla A1.1 Combinación de los diferentes vectores utilizados para la comprobación de la mejora del sistema Split-Trp	141



Introducción

1. La membrana plasmática: importancia biológica

La membrana plasmática es la estructura que define la extensión de la célula y que constituye el límite o borde contenedor de los componentes celulares, separándolos del medio y creando las condiciones que posibilitan el conjunto de reacciones bioquímicas que dan lugar a la vida. Al mismo tiempo, la membrana plasmática constituye la estructura que relaciona a la célula con su entorno y por tanto su composición variará en el tiempo y en respuesta a un ambiente variable, siendo en consecuencia una estructura dinámica (Sabatini, 2005). En su cara externa, la membrana plasmática presenta los dominios extracelulares de las proteínas que la atraviesan o que se anclan a ella, y que determinarán la gama de interacciones que la célula establecerá con su ambiente. Esto incluye interacciones con otras células, con la matriz extracelular, con nutrientes, con iones, con diferentes estímulos o con patógenos. En la cara interna, por el contrario, es donde se establecen las interacciones moleculares implicadas en la forma y el movimiento celular, el tráfico endocítico o las cascadas de señales desencadenadas por estímulos externos (Anderson et al., 2003). De este modo, la composición de la membrana plasmática determina las funciones necesarias para la nutrición y la homeostasis celular y participa en la elaboración de respuestas celulares adecuadas frente a un entorno variable (Conner y Schmid, 2003). En definitiva, la membrana plasmática juega un papel fundamental en la supervivencia celular y en la adecuada integración de las células en el medio en el que se encuentran inmersas.

1.1. Proteínas de transporte de la membrana plasmática

Los transportadores de membrana son la puerta de entrada para la mayor parte de nutrientes utilizados por las células en la generación de energía, construcción de elementos básicos para el mantenimiento celular y asegurar de esta manera su crecimiento y desarrollo. En este sentido, las proteínas transportadoras pueden ejercer un control importante sobre todas las actividades celulares, ya sea como simples proveedores de nutrientes o señalizando la presencia o ausencia de estos a la maquinaria celular (Conner y Schmid, 2003).

Los transportadores pueden actuar como sistemas de transporte pasivo, trasladando solutos a favor de potencial electroquímico, o como sistemas de transporte activo, utilizando energía para el transporte de los mismos en contra de su potencial electroquímico. Este transporte activo esta mediado por transportadores cuya función está acoplada directamente al uso de energía derivada de la hidrólisis de una molécula de ATP, o por transportadores que utilizan un gradiente electroquímico pre-establecido en forma de potencial de membrana, que resultará en el co-transporte del sustrato acoplado al transporte de iones. En esta última categoría se engloban los simportadores y antiportadores, que transportan los iones en la misma dirección o en la dirección opuesta, respectivamente, que el sustrato objeto de transporte.

Muchas de las proteínas transportadoras en levadura presentan un alto porcentaje de similitud con proteínas en otros organismos, desde bacterias hasta humanos, hecho que refleja la importancia de su estudio en levaduras como plataforma inicial para la posterior extrapolación a organismos superiores. En *S. cerevisiae* se han identificado 282 transportadores transmembrana, de los que 125 están localizados en la membrana plasmática (Van y André, 2001). Algunos de estos transportadores, como la ATPasa Pma1, son necesarios en todas las fases de crecimiento y por tanto son sintetizados continuamente, manteniendo así niveles más o menos constantes en la membrana plasmática. Otros, por el contrario, están rigurosamente regulados por las condiciones ambientales y su presencia o ausencia en la membrana dependerá de las circunstancias a las que se enfrente la célula en cada momento. Cada transportador de membrana debe ser regulado de manera específica, permitiendo de este modo la viabilidad de las células en un ambiente sometido a constantes cambios. Esta regulación puede darse a distintos niveles, siendo fundamentales la transcripción génica, la modulación de la actividad intrínseca y el tráfico intracelular.

1.2. Transportadores de iones en *Saccharomyces cerevisiae*

Además de los componentes mayoritarios de las moléculas orgánicas, carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno, los organismos vivos requieren gran variedad de elementos químicos para su crecimiento. En el entorno acuoso de las células estos elementos se encuentran como iones cargados, que junto a protones e iones hidróxido facilitan las reacciones bioquímicas. Los iones, que no pueden atravesar libremente las bicapas lipídicas debido a su carga, proporcionan la

materia prima para establecer gradientes electroquímicos que dirigen diferentes procesos celulares tales como la síntesis de ATP. El potasio es fundamental para neutralizar las cargas negativas del interior celular y para activar procesos tan básicos como la traducción de proteínas. Elementos traza como el zinc, cobre, hierro o manganeso son determinantes para la estructura de las proteínas al mismo tiempo que sirven como cofactores para gran variedad de enzimas, así como el calcio que juega un papel básico en la señalización intracelular además de poseer implicaciones enzimáticas (revisado en Cyert y Philpott, 2012). A pesar de sus roles fundamentales, todos estos elementos pueden resultar tóxicos para las células si no son correctamente regulados. Por ello, las células han desarrollado sofisticados mecanismos para mantener su homeóstasis y de esta manera regular sus niveles evitando concentraciones tóxicas. Estudios en levadura han identificado componentes clave en la toma, uso y regulación de la concentración de estos iones, pero además, y debido al alto grado de similitud de estos mecanismos en otros organismos, la levadura ha servido como un excelente modelo para la identificación de dichos mecanismos en humanos, ayudando al entendimiento de enfermedades derivadas de defectos en la homeóstasis de iones, o en plantas, contribuyendo al desarrollo mediante ingeniería genética de especies con valores añadidos. En la figura 1 se muestra el esquema de los principales transportadores de cationes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

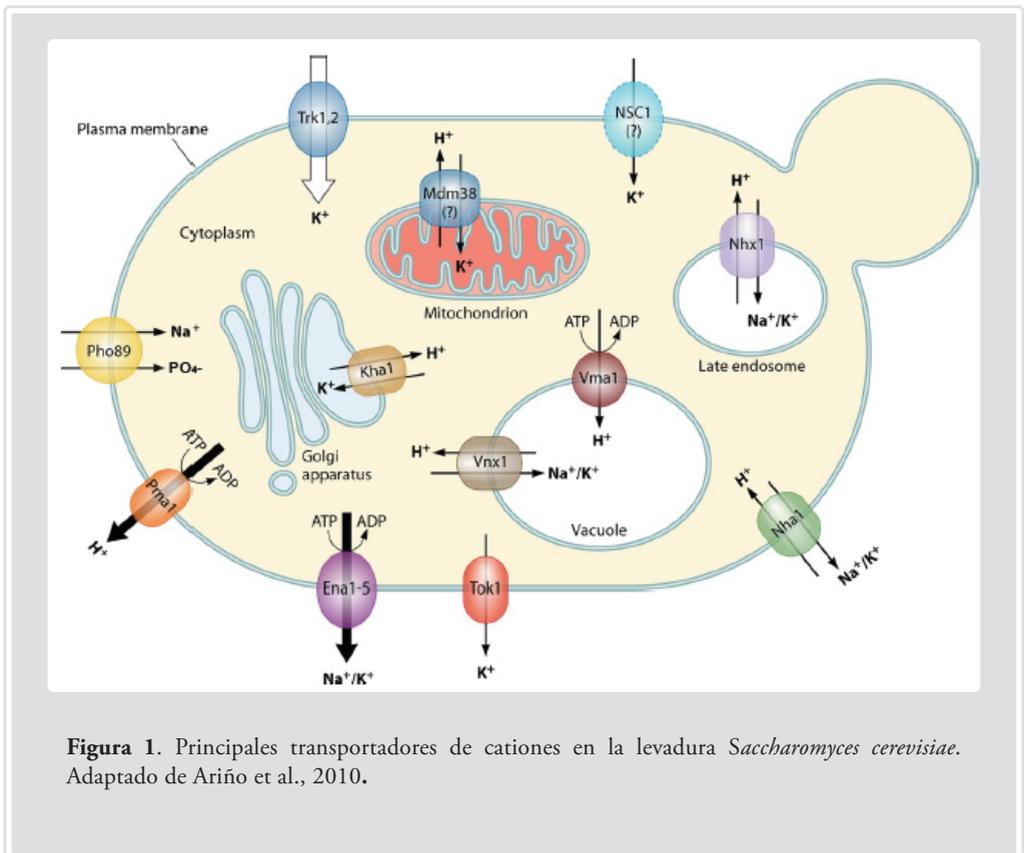


Figura 1. Principales transportadores de cationes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Ariño et al., 2010.

1.2.1. *Pma1, la bomba de protones esencial.*

Pma1, una ATPasa de tipo P2 compuesta por una única subunidad de 100-kDa, es la encargada de bombear protones a través de la membrana plasmática desde el interior de la célula hacia al espacio extracelular, a relación de un protón por molécula de ATP hidrolizada (Perlin *et al.*, 1986). Esta proteína integral de membrana es un transportador esencial en células de levadura y es la responsable, por ejemplo, de la regulación del pH intracelular. Del mismo modo, su actividad electrogénica crea el gradiente electroquímico requerido para el transporte secundario de iones y la toma de nutrientes a través de la membrana plasmática (Serrano *et al.*, 1986). Esta H⁺-ATPasa es una de las proteínas más abundantes en la célula y su actividad supone el consumo de un 20% del ATP total. Pma1 es una proteína fundamental para el crecimiento y por ello su función debe ser estrechamente regulada dependiendo del estado metabólico y fisiológico de las células, siendo la glucosa y el pH ácido dos de los principales estímulos que regulan su función.

Los niveles extracelulares de glucosa, así como un incremento en la toma de potasio, suponen una regulación positiva de la actividad de Pma1 (Serrano, 1983; Seto-Young y Perlin, 1991). Por el contrario, mutaciones que afectan a su actividad disminuyen el pH citosólico y el crecimiento celular (McCusker *et al.*, 1987; Portillo y Serrano, 1989), reducen la capacidad de crecimiento en medio con bajo pH o en presencia de ácidos débiles y originan fenotipos de resistencia a diferentes compuestos catiónicos como la higromicina B, consecuencia de un potencial de membrana alterado que se traduce en la disminución de la toma de este tipo de moléculas tóxicas (Perlin *et al.*, 1988).

S. cerevisiae codifica una segunda H⁺-ATPasa, Pma2, que presenta un grado de similitud del 89% con Pma1 (Schlessler *et al.*, 1988) y que pese a ser capaz de exportar protones su actividad enzimática difiere con respecto a Pma1. Pma2 se encuentra normalmente a niveles muy bajos, pudiendo sustituir a Pma1 solo cuando se expresa bajo el control de un promotor fuerte (Supply *et al.*, 1993).

1.2.2. *Trk1 y Trk2, el sistema de transporte de potasio de alta afinidad.*

Como ya hemos visto, el mantenimiento de la homeóstasis iónica es un proceso fundamental en todos los organismos vivos. En este sentido, el potasio (K⁺) es el catión más abundante en el interior de las células y está implicado en diversos parámetros fisiológicos tales como el turgor, el mantenimiento del potencial de membrana, la fuerza iónica o el pH intracelular. El K⁺ se acumula en el interior celular en contra de gradiente gracias a la actividad de diferentes sistemas de transporte. En condiciones óptimas de crecimiento el contenido intracelular de K⁺ en células de levadura oscila entre 200-300 mM. Sin embargo, *S. cerevisiae* es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones externas de K⁺, que va desde valores micromolares (10 μM) hasta 2.5 M (Ariño *et al.*, 2010).

Los productos génicos responsables de la toma de K^+ , las proteínas Trk1 y Trk2, fueron identificadas utilizando rastreos de mutantes incapaces de crecer en condiciones limitantes de K^+ (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990; Ko y Gaber, 1991). De las dos proteínas identificadas, Trk1 es la principal implicada en la entrada de potasio a la célula debido a sus mayores niveles de expresión, aunque el papel de Trk2 también fue demostrado como importante ya que los mutantes *trk1 trk2* necesitan ser suplementados con concentraciones de K^+ 10 veces superiores respecto al mutante simple *trk1*. Trk1 y Trk2 son proteínas de membrana grandes, compuestas por 1235 y 889 aminoácidos respectivamente, conteniendo cada una de ellas cuatro motivos M1-P-M2 (membrana-poro-membrana) donde M1 y M2 se corresponden con dominios hidrofóbicos conectados por segmentos P con estructura α -hélice (Durell y Guy, 1999; Gaber *et al.*, 1988). El transporte mediado por Trk1/2 presenta alta afinidad tanto por K^+ como por Rb^+ y su velocidad de transporte se ha estimado en 30 nmol/mg células/min, transporte que es impulsado por el potencial electroquímico negativo generado en el interior de la célula por la H^+ -ATPasa (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). El sistema TRK es uno de los principales determinantes del potencial eléctrico de la membrana plasmática y como consecuencia 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. Además de su implicación en el transporte de K^+ , también ha sido descrito para Trk1 un papel en el flujo de salida de iones cloruro como consecuencia de la formación de un poro central tras el establecimiento de un homotetrámero de subunidades Trk1 (Kuroda *et al.*, 2004), papel que también ha sido sugerido para Trk2.

1.3. Transportadores de azúcares en *Saccharomyces cerevisiae*

En su hábitat natural, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se enfrenta a un amplio rango de concentraciones de azúcar que van desde las altas concentraciones que pueden superar valores de 1.5 M en frutos en maduración o descomposición, a valores cercanos a concentraciones micromolares (Weusthuis *et al.*, 1994). Para hacer frente a estas fluctuaciones en la concentración de azúcar, *S. cerevisiae* ha desarrollado una compleja familia de transportadores de azúcares con características y cinéticas específicas para cada uno de sus miembros, permitiendo a las células ajustar el transporte de hexosas en cada situación y optimizar así el crecimiento y el metabolismo celular (revisado en Horák, 2013). Entre la variedad de hexosas disponibles, la glucosa es la principal fuente de carbono y energía tanto para *S. cerevisiae* como para la mayoría de las células. Aparte de ser un nutriente esencial, la glucosa puede ser considerada como una molécula señalizadora, ya que está implicada en procesos esenciales como el crecimiento, el metabolismo y el desarrollo celular (Rolland *et al.*, 2002). Conocer cómo las células perciben y señalizan la presencia de glucosa, cómo se optimiza su uso y como la glucosa afecta al metabolismo son cuestiones esenciales que, en parte, siguen sin estar resueltas.

El primer paso del metabolismo de los azúcares es su transporte al interior de la célula. En la levadura *S. cerevisiae* las hexosas son incorporadas a la célula por difusión facilitada a través de la membrana plasmática mediante transportadores específicos (Heredia *et al.*, 1968). La tasa de

transporte en células que se encuentran en fase de crecimiento óptimo puede superar las 10^7 moléculas de glucosa/célula/segundo.

Dado el gran número de transportadores de hexosas existentes, estos están sometidos a una regulación muy precisa y solo serán expresados aquellos que sean necesarios en cada momento. Un ejemplo que ilustra esta regulación es la respuesta a la abundancia de hexosas fácilmente fermentables, como la glucosa o la fructosa, donde las células no expresan los sistemas de transporte ni los componentes metabólicos necesarios para utilizar fuentes de carbono alternativas como galactosa o maltosa (Gancedo, 1998; Carlson, 1998). Este patrón jerárquico se establece mediante complejas redes de regulación de mecanismos que actúan tanto a nivel transcripcional como postraduccionial.

La glucosa tiene dos efectos principales en la expresión génica. Por un lado, induce la transcripción de genes que codifican enzimas glicolíticas, proteínas ribosomales y transportadores de glucosa que aseguren el correcto metabolismo de la glucosa en un proceso llamado inducción por glucosa (Özcan y Johnston, 1995). Por otra parte, reprime la expresión de genes que codifican proteínas esenciales para el transporte y la utilización de fuentes de carbono alternativas, enzimas de la gluconeogénesis y respiración (Carlson, 1998; Johnston, 1999). Además, la glucosa también posee efectos de regulación a nivel postraduccionial como el mecanismo de degradación por catabolito, utilizado por las células para regular la actividad de algunas enzimas clave en gluconeogénesis y de transportadores de azúcares en respuesta a fuentes de carbono preferidas (Jiang *et al.*, 2000; Lucero *et al.*, 2001). Por ello, la glucosa sirve como estímulo ambiental para regular la cantidad, tipo y actividad de los transportadores de azúcares tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccionial.

1.3.1. La familia HXT, transportando glucosa al interior de la célula.

A lo largo de los años, se han descrito 20 proteínas implicadas directa o indirectamente en el transporte de hexosas en levadura. Los transportadores de hexosas, pertenecientes a la familia HXT, son proteínas con 12 dominios transmembrana incluidos en la superfamilia de transportadores de solutos (Marger y Saier, 1993) y presentan una alta similitud de secuencia. Dentro de esta gran familia convergen los transportadores de glucosa Hxt1-Hxt17 (revisado en Özcan y Johnston, 1999), el transportador de galactosa Gal2 (Nehlin *et al.*, 1989; Szkutnicka *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1989) y Rgt2 y Snf3, descritos como los sensores celulares de los niveles de glucosa (Özcan *et al.*, 1996). Dada la gran cantidad de transportadores de glucosa, existe redundancia funcional y ninguno en sí mismo es esencial para el crecimiento. A pesar de estar compuesta por un gran número de transportadores, solo 7 miembros de la familia HXT han sido descritos como importantes para la toma de glucosa por parte de las células. Cepas que presentan deleciones en los genes comprendidos entre *HXT1* y *HXT7* son incapaces de crecer en glucosa debido a la imposibilidad de transportar el sustrato, originando la carencia de flujo glicolítico. La

introducción de cualquiera de los 7 genes HXT que codifican transportadores funcionales resulta suficiente para recuperar el fenotipo de crecimiento en glucosa (Reifenberger *et al.*, 1995).

En células de *S. cerevisiae* solo serán expresados los transportadores de glucosa necesarios en función de la cantidad de glucosa disponible en el medio. Esta respuesta fisiológica se debe a la acción conjunta de diferentes mecanismos reguladores, que incluyen mecanismos tanto transcripcionales (Ozcan y Johnston, 1995) como postraduccionales (Wendell y Bisson, 1994; Krampe *et al.*, 1998). En función del momento en que son expresados, los transportadores mencionados anteriormente se pueden englobar en tres sistemas de transporte dependiendo de su afinidad por la glucosa: uno de baja afinidad, que comprende aquellos transportadores expresados en condiciones de altos niveles de glucosa disponible, uno de afinidad moderada y otro de alta afinidad, reprimido por glucosa, y que incluye aquellos transportadores que serán expresados cuando los niveles de glucosa sean limitantes. Según esta clasificación, la siguiente tabla muestra los principales componentes de la familia HXT.

Tabla 1. Características de los transportadores de la familia HXT. La afinidad del transportador por el sustrato se presenta en Km, que refleja la relación entre las constantes cinéticas y caracteriza la interacción del transportador con su sustrato

Proteína	Características	Regulación	Referencias
Hxt1	Transportador de baja afinidad. $K_m = 100$ mM	Se induce hasta 300 veces en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa (>1%)	Reifenberger <i>et al.</i> , 1997; Maier <i>et al.</i> , 2002.
Hxt2	Transportador de afinidad moderada. $K_m = 10$ mM	Expresión máxima a bajas concentraciones de glucosa (0.1%) y mínima a concentraciones elevadas. Afinidad por el sustrato modulada por la concentración de glucosa.	Ozcan y Johnston, 1996; Reifenberger <i>et al.</i> , 1997; Maier <i>et al.</i> , 2002. Zaman <i>et al.</i> , 2009.
Hxt3	Transportador de baja afinidad. $K_m = 30-60$ mM	Su inducción requiere glucosa aunque es poco dependiente de la concentración.	Ozcan y Johnston, 1996; Reifenberger <i>et al.</i> , 1997; Maier <i>et al.</i> , 2002; Zaman <i>et al.</i> , 2009.
Hxt4	Transportador de afinidad moderada. $K_m = 10$ mM	Expresión máxima a bajas concentraciones de glucosa (0.1%) y mínima a concentraciones elevadas.	Ozcan y Johnston, 1996; Reifenberger <i>et al.</i> , 1997; Maier <i>et al.</i> , 2002; Zaman <i>et al.</i> , 2009.
Hxt5	Transportador de afinidad moderada. $K_m = 10$ mM	Regulación dependiente de tasa de crecimiento y no de concentración de glucosa. Inducción máxima en células con bajos niveles de crecimiento.	Diderich <i>et al.</i> , 1999; Verwaal <i>et al.</i> , 2004; Zaman <i>et al.</i> , 2009.
Hxt6 y Hxt7	Transportadores de alta afinidad. $K_m = 1$ mM	Expresión en niveles de glucosa muy bajos, fuentes de carbono no fermentables, maltosa y galactosa. Represión en respuesta a altas y moderadas concentraciones de glucosa.	Reifenberger <i>et al.</i> , 1997; Maier <i>et al.</i> , 2002; Ye <i>et al.</i> , 2001; Zaman <i>et al.</i> , 2009.

Proteína	Características	Regulación	Referencias
Hxt8- Hxt17	Transportadores de hexosas funcionales que no contribuyen significativamente al total de la actividad de transporte. Algunas de sus funciones no están directamente relacionadas con el transporte de hexosas.	Excepto los genes <i>HXT11</i> y <i>HXT12</i> , todos están regulados por glucosa.	Özcan y Johnston, 1999
Hxt9 Hxt11	Implicados en fenotipos de resistencia a drogas.	Intervienen Pdr1 y Pdr3 como reguladores transcripcionales	Nourani <i>et al.</i> , 1997.
Hxt10	Capaz de transportar trióxido de arsénico al interior de la célula como ocurre con los principales transportadores de hexosas.		Liu <i>et al.</i> , 2004.
Hxt13 Hxt15		Expresión favorecida por fuentes de carbono no fermentables.	Greatrix y van Vuuren, 2006.
Hxt17		Expresión en células crecidas en rafinosa a pH 7.7 pero no a pH 4.7	Greatrix y van Vuuren, 2006.
Gal2	Transportador de galactosa de alta y baja afinidad.	Expresión en células crecidas en galactosa.	Ramos <i>et al.</i> , 1989
Rgt2 y Snf3	Sensores de altos y bajos niveles de glucosa respectivamente. No transportan glucosa al interior celular. Son los encargados de generar las señales de inducción de los diferentes genes HXT.	Baja expresión endógena. <i>RGT2</i> se expresa constitutivamente. <i>SNF3</i> es reprimido por glucosa.	Özcan <i>et al.</i> , 1996.

2. Regulación de la expresión de transportadores de membrana a nivel transcripcional

Como se ha mencionado con anterioridad, una de las características de las células es su capacidad de adaptación a las variaciones del entorno en el que se desarrollan. Esta aptitud para la aclimatación al medio cambiante permite la obtención de la mayor cantidad de energía posible en unas determinadas condiciones, hecho tan esencial para la supervivencia como el ahorro de la misma. Por esta razón, la regulación de la expresión génica supone una herramienta elemental para la adaptación al medio, adecuando la maquinaria bioquímica en función de las variaciones físico-químicas del exterior.

Los organismos eucariotas, y entre ellos la levadura, han desarrollado complejos patrones de expresión génica que son modificados a lo largo de su ciclo de vida y como respuesta a las señales del entorno. El control transcripcional es el mecanismo a través del cual se regulan los niveles y el momento en el que un gen se expresa, y supone una de las formas más importantes de la regulación de la expresión proteica. Gran parte de los mecanismos descritos que regulan la expresión génica en función de los factores ambientales desempeñan un control en el inicio de la transcripción. La razón es sencilla: actuando a nivel transcripcional el consumo energético es menor que cuando se degrada o inactiva una proteína ya sintetizada.

Los transportadores de membrana presentan notables diferencias en cuanto a su regulación. En determinados casos la regulación de la cantidad de estas proteínas tiene un importante componente transcripcional, mientras que en otros casos su regulación se llevará a cabo mayoritariamente a nivel postraduccional. Estas diferencias radican en la naturaleza de las proteínas, es decir, proteínas esenciales a lo largo de todo el ciclo vital de las células serán reguladas principalmente a nivel postraduccional, siendo el principal objetivo la modulación de su actividad, mientras que aquellas proteínas transportadoras cuyo requerimiento viene determinado por las condiciones ambientales tendrán una importante regulación transcripcional, asegurando así su expresión solo cuando sean realmente necesarias para la supervivencia de las células.

2.1. Regulación transcripcional de *PMA1*.

A pesar del progreso en el entendimiento de las bases moleculares de las ATPasas en diferentes organismos, la información disponible acerca de la región promotora de *PMA1* y de los mecanismos que regulan su expresión es relativamente limitada, habiéndose dedicado gran parte del trabajo a la caracterización de las diferentes regiones reguladoras de su promotor y al aislamiento de mutantes con efectos sobre la expresión del gen *PMA1*. Estudios han demostrado como *PMA1* es un gen con altos niveles de expresión (Serrano, 1988), hecho que explica el elevado porcentaje de esta H⁺-ATPasa en la membrana plasmática. Esta observación, junto con la elevada vida media del transportador, contribuye al mantenimiento de una cantidad constante de Pma1 a lo largo del ciclo de crecimiento de la levadura (Mason *et al.*, 1998) y sugiere una regulación mayoritariamente postraduccional.

Estudios basados en las secuencias reguladoras del promotor de *PMA1* mostraron como entre los factores de transcripción implicados en su regulación se encuentra Rap1, proteína de unión a DNA implicada en funciones esenciales como el control de la longitud de los telómeros (Shore, 1997) o la regulación de enzimas glicolíticas (Uemura *et al.*, 1992). Otro factor de transcripción implicado en la regulación de enzimas glicolíticas y con secuencia de unión en el promotor de *PMA1* es Gcr1 (Baker, 1991), que fue propuesto, actuando en coordinación con Rap1, como regulador del gen *PMA1* en respuesta a glucosa (Rao *et al.*, 1993, García-Arranz *et al.*, 1994). Tanto Mcm1, un factor de transcripción esencial de la familia MADS box que regula una amplia variedad de genes, como Gln3, implicado en la regulación de genes importantes para la toma y degradación de fuentes de nitrógeno, poseen secuencias de unión en la región promotora de *PMA1*, poniendo de manifiesto la importancia de Pma1 tanto a lo largo del ciclo celular (Kuo y Grayhack, 1994) como en la respuesta frente a la escasez de nitrógeno (Cox *et al.*, 1999). El análisis del promotor de *PMA1* muestra, además, la presencia de una región rica en T que en otros promotores, como el de *HIS3*, se demostró como responsable de su expresión constitutiva (Struhl, 1985), aunque en el caso de *PMA1* esta función no ha sido evidenciada.

Entre las condiciones de crecimiento que han demostrado tener un efecto negativo en los niveles de mRNA de *PMA1*, se encuentran el crecimiento en medio con bajas concentraciones de ácido octanoico (Viegas *et al.*, 1994), el crecimiento a temperaturas supraóptimas (Viegas *et al.*, 1995) o el crecimiento de las células a pH 2.5 (Carmelo *et al.*, 1996). Por el contrario, células cultivadas en medio con etanol como única fuente de carbono o células que alcanzan la fase estacionaria después del crecimiento diáuxico, presentan mayores niveles de expresión de *PMA1* (Fernandes *et al.*, 2003). A pesar de los estudios llevados a cabo en la caracterización de los patrones de expresión de *PMA1*, como hemos mencionado anteriormente, la mayor parte de la regulación de Pma1 se produce a nivel postraduccional, hecho que concede mayor protagonismo a la modulación de su actividad en respuesta a las diferentes condiciones ambientales.

2.2. Regulación transcripcional de *TRK1* y *TRK2*

La actividad de estos transportadores, al igual que en el caso de Pma1, no parece tener un componente importante de regulación que implique mecanismos transcripcionales, por lo que su regulación será mayoritariamente postraduccional (Ariño *et al.*, 2010, Perez-Valle *et al.*, 2010). En el caso de *TRK1*, a pesar de que se observaron niveles menores de expresión en células en fase estacionaria (Gasch *et al.*, 2000), no existen evidencias experimentales que demuestren que los niveles de mRNA se vean alterados en respuesta a ayuno de potasio o a diferentes tipos de estrés iónico. Por lo que respecta a *TRK2*, algunos estudios sugieren una regulación transcripcional más compleja al haberse demostrado que el complejo histona desacetilasa Rpd3/Sin3 y el elemento represor URS1, situado en el promotor de *TRK2*, regulan negativamente la expresión de este gen (Vidal *et al.*, 1995). Del mismo modo que para *TRK1*, la expresión de *TRK2* no se ve alterada en respuesta a estrés iónico. La ausencia de una regulación transcripcional importante en el gen *TRK1*

no es exclusiva de la levadura *S.cerevisiae*. Estudios realizados en levaduras no convencionales como *Debaryomyces occidentalis* o *Debaryomyces hansenii* demostraron que en estas especies tampoco existen evidencias experimentales de la regulación transcripcional del gen *TRK1* bajo condiciones de estrés o ayuno de cationes (Bañuelos *et al.*, 2000; Pista *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011). En el caso de *Neurospora crassa* se ha demostrado la expresión constitutiva del gen (Rivetta *et al.*, 2013). Como hemos apuntado anteriormente, los antecedentes acerca de la regulación transcripcional de *TRK1* apuntan a una regulación mayoritariamente a nivel proteico y basada, fundamentalmente, en la regulación de su actividad.

2.3. Regulación transcripcional de transportadores de hexosas.

A diferencia de los transportadores citados anteriormente, la regulación transcripcional de los transportadores de azúcares viene dada por una compleja red de interacciones que, de forma constante, controlan los niveles de glucosa disponibles. Los patrones de expresión de los principales transportadores de esta familia, Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6 y Hxt7 son el resultado de la interacción de rutas de detección y señalización que convergen para asegurar la correcta expresión de los transportadores necesarios en función de los niveles de glucosa disponibles. La primera de ellas es la ruta de inducción por glucosa Snf3/Rgt2-Rgt1 (Figura 2), que se inicia a través de los sensores de glucosa Snf3/Rgt2 y culmina con la unión del factor de transcripción Rgt1 a los promotores de los genes *HXT*, reprimiendo su expresión en células crecidas en ausencia de glucosa (Ozcan *et al.*, 1996; Ozcan *et al.*, 1998). Esta represión a través de Rgt1 se produce

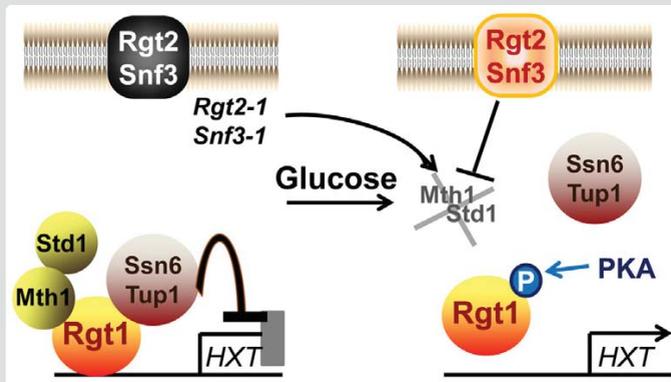


Figura 2. Modelo simplificado de la ruta de inducción por glucosa de los genes *HXT*. Los sensores Rgt2 y Snf3 experimentan un cambio conformacional tras su unión a glucosa, generando una señal que conduce a la degradación de Mth1 y Std1 en el proteasoma. La fosforilación de Rgt1 por PKA induce su disociación del complejo Ssn6-Tup1 y de sus promotores diana, permitiendo la expresión de genes *HXT*. Roy *et al.*, 2013.

conjuntamente con las proteínas parálogas Mth1 y Std1, que se unen a Rgt1 siendo necesarias para su actividad como represor transcripcional, y junto a los co-represores Ssn6 y Tup1 (Ozcan y Johnston, 1995; Polish *et al.*, 2005) que se unen junto con Rgt1 a los promotores de los genes diana. En presencia de glucosa se inhibe la actividad represora de Rgt1 a través de la degradación de Mth1 y Std1 (Flick *et al.*, 2003; Moriya y Johnston, 2004), acción que libera a Rgt1 y produce la desrepresión de los genes HXT (Kim *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, la fosforilación de Rgt1 en respuesta a glucosa lo convierte en activador transcripcional (Mosley *et al.*, 2003).

Según el modelo establecido, en respuesta a glucosa se produce un cambio conformacional en los sensores Snf3/Rgt2, que pasan de su forma inactiva a la forma activa que es la responsable de la activación de las quinasas Yck1 e Yck2 ancladas en la membrana plasmática. Esta activación produce la fosforilación de Mth1 y Std1 que previamente habrán sido translocados del núcleo al citoplasma en respuesta a glucosa, donde interaccionan físicamente con las colas de los receptores Snf3/Rgt2. La fosforilación de Mth1 y Std1 permitirá su posterior ubiquitinación por el complejo SCF^{Grr1} y como consecuencia su degradación en el proteasoma (Flick *et al.*, 2003; Moriya y Johnston 2004; Spielewoy *et al.*, 2004) (Figura 3). Sin embargo, estudios posteriores sugieren que no existe una translocación nucleo-citoplasma de Mth1 en respuesta a glucosa y que su degradación se produce en el núcleo, degradación que no implicaría la interacción directa con las quinasas Yck1/2, sino con una quinasa no identificada que en respuesta a glucosa sería reclutada por los sensores, activada por Yck1/2 y que posteriormente viajaría al núcleo donde fosforilaría a Mth1 desencadenando su degradación (Pasula *et al.*, 2010).

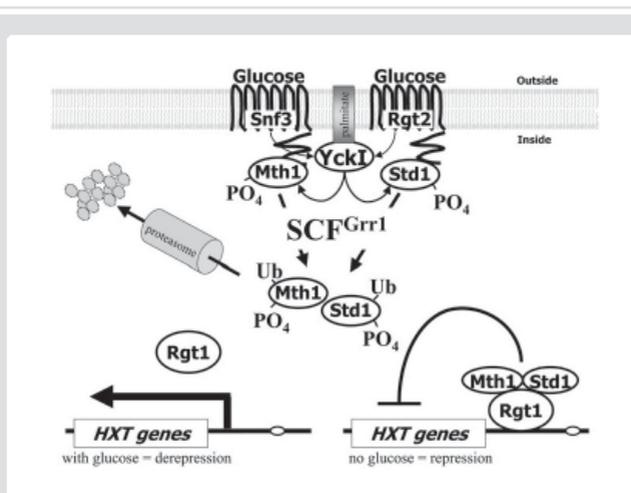
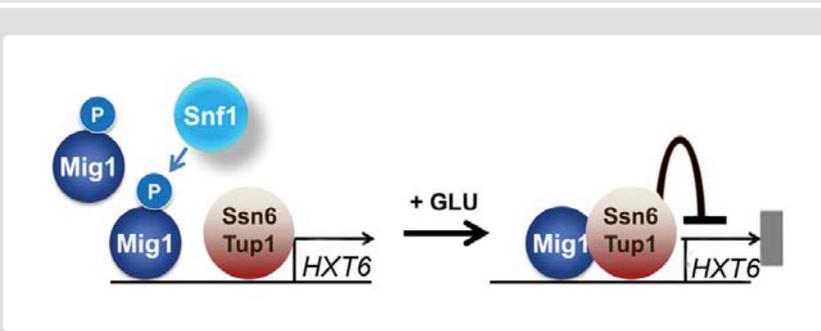


Figura 3. Diagrama de la ruta de transducción por glucosa responsable de la inducción de los genes HXT. La unión de la glucosa a los sensores Rgt2/Snf3 activan a Yck1, que fosforilará a los reguladores transcripcionales Mth1 y Std1 unidos previamente a la cola C-terminal de los sensores. La fosforilación permite a SCF^{Grr1} ubiquitinar a Mth1 y Std1 marcándolos para su degradación en el proteasoma. Sin Mth1 y Std1, Rgt1 no tiene capacidad de unión a DNA, resultando en la desrepresión de los genes HXT. Adaptado de Johnston y Kim, 2005.



4. Modelo de la ruta de represión por glucosa responsable de la represión de genes *HXT*. En condiciones limitantes de glucosa la quinasa Snf1 fosforila a Mig1, previniendo su interacción con Ssn6-Tup1. En condiciones de alta glucosa, Snf1 es inactiva y por tanto Mig1 permanecerá defosforilado, formando complejo con Ssn6-Tup1 y reprimiendo a sus genes diana. Roy *et al.*, 2013.

La segunda ruta implicada en el control transcripcional de los genes *HXT* es la responsable de prevenir la expresión de los transportadores Hxt de moderada y alta afinidad (Hxt2, Hxt4, Hxt6 y Hxt7) en presencia de altas concentraciones de glucosa (Ozcan y Johnston, 1995; Johnston y Kim, 2005) y es la denominada ruta de represión Snf1-Mig1 (Figura 4). En esta ruta se encuentran implicadas principalmente la quinasa Snf1, el factor de transcripción Mig1 y el complejo fosfatasa Glc7/Reg2. En respuesta a bajas concentraciones de glucosa, la quinasa Snf1 es activada mediante la fosforilación del residuo Thr210 de la subunidad catalítica (McCartney y Schmidt, 2001) en una reacción llevada a cabo por una de las tres quinazas parcialmente redundantes Sak1, Elm1 o Tos1 que actúan aguas arriba de Snf1 (Hong *et al.*, 2003). Por el contrario, en respuesta a altas concentraciones de glucosa se produce la desfosforilación del mismo residuo que resulta en la desactivación de Snf1, reacción llevada a cabo por el complejo fosfatasa Reg1/Glc7 (Ludin *et al.*, 1998, Sanz *et al.*, 2000). En la regulación de la actividad de Reg1 está implicada tanto Snf1 (Sanz *et al.*, 2000) como Hxk2, cuya implicación en el estado de fosforilación de Reg1 ha sido propuesto aunque se desconoce el mecanismo de acción (Sanz *et al.*, 2000). En última instancia la diana de Snf1 es el factor de transcripción Mig1, que en su forma defosforilada actúa como represor transcripcional al unirse a los promotores de sus genes diana en asociación con los co-represores Ssn6 y Tup1 (Treitel y Carlson, 1995).

La función represora de Mig1 depende de su localización, que a su vez depende de su estado de fosforilación (Figura 4). En condiciones limitantes de glucosa, la forma activa de Snf1 fosforila a Mig1 en al menos cuatro residuos de serina (Smith *et al.*, 1999), que sirven como señal para su exclusión del núcleo (DeVit *et al.*, 1997) y en consecuencia se desreprimen los genes diana. Por el contrario, en presencia de cantidades no limitantes de glucosa, Mig1 se mantiene defosforilado, en el núcleo y asociado a los promotores de los genes sobre los que actúa como represor transcripcional. En conclusión, la represión por glucosa es el resultado de tres reacciones negativas consecutivas: la glucosa inactiva a Snf1, deteniendo la fosforilación de Mig1 que en consecuencia reprimirá a sus genes diana (Figura 5).

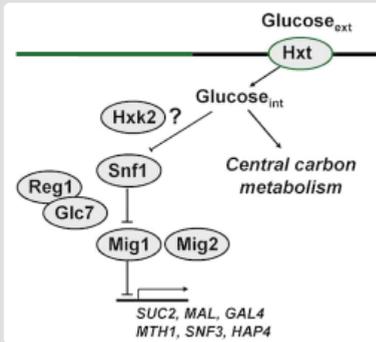


Figura 5. Modelo de la principal ruta de represión por glucosa. La señal originada por altas concentraciones de glucosa inactiva el complejo Snf1 a través de la fosfatasa Glc7-Reg1. Bajo estas condiciones Mig1 permanecerá desfosforilado y en el núcleo ejerciendo de represor de diversos genes. En respuesta a bajos niveles de glucosa Snf1 es activada y Mig1 fosforilado y translocado al citosol, liberando la represión de sus genes diana. Adaptado de Johnston y Kim, 2005.

Adicionalmente a las dos rutas anteriores, la función de Rgt1, último actor en la cascada de señalización originada por Snf3/Rgt2, también puede ser regulada por fosforilación mediante una tercera ruta de señalización, la ruta cAMP/PKA (Kim y Johnston, 2006). Cuando Rgt1 es fosforilado por PKA tras su activación por glucosa, su capacidad de unión a DNA se ve disminuida y su función como supresor es anulada. Al mismo tiempo, y después de dejar de formar complejo con Mth1 y Std1, la fosforilación de Rgt1 en su extremo N-terminal por PKA lo convierte en activador transcripcional en respuesta a altas concentraciones de glucosa (Jouandot *et al.*, 2011).

Aunque las rutas de señalización Snf3/Rgt2-Rgt1 y Snf1-Mig1 detectan y transmiten las señales generadas por glucosa de manera diferente, no pueden ser consideradas como rutas independientes ya que existen conexiones entre ellas, como por ejemplo la necesidad de inactivación de Snf1 para la eliminación

proteolítica de Mth1/Std1 en la inducción de *HXT1* o el posible papel de Std1 en la activación de Snf1 a través de la interacción con su subunidad catalítica (Tomás-Cobos y Sanz, 2002).

Además de las principales rutas descritas en párrafos anteriores, existen rutas adicionales implicadas en el control transcripcional de los genes *HXT* (Figura 6). Por ejemplo, el componente de la ruta TOR, Tor1, y las proteínas 14-3-3 se demostraron partícipes de la regulación transcripcional de *HXT1* (Tomás-Cobos *et al.*, 2005) al igual que fue señalada la implicación de Hog1, proteína implicada mayoritariamente en respuesta a estrés osmótico, en la regulación de este mismo gen a través de la modulación del complejo represor Sko1-Tup1-Ssn6 (Tomás-Cobos *et al.*, 2004).

El análisis conjunto de estos datos pone en evidencia la compleja regulación transcripcional de los genes de la familia *HXT* y de cómo su expresión se produce a través de la convergencia entre diferentes rutas (Figura 6), que como resultado establecen patrones de expresión altamente regulados que aseguran la correcta activación o represión de cada uno de ellos en función de las condiciones a las que se enfrentan las células.

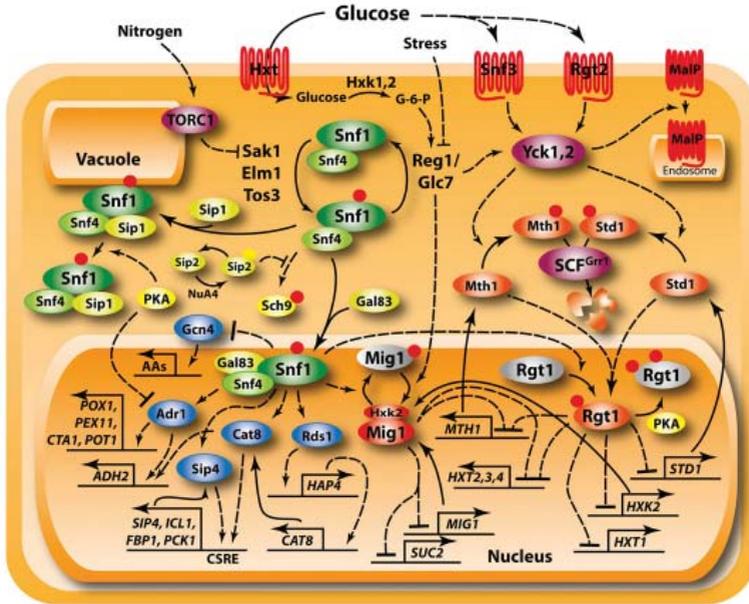


Figura 6. Rutas Snf1 y Rgt. La ruta Snf1 (iconos verdes y amarillos) y Rgt (iconos morados y naranja) son rutas entrelazadas que regulan el uso de fuentes de carbono alternativas principalmente a través de una amplia red de activadores (iconos azules) y represores transcripcionales (iconos rojos y naranja). En esta red se integran también componentes de la respuesta a nitrógeno que inciden sobre la actividad de Snf1 a través de diferentes rutas. Broach, 2012.

3. Regulación postraduccional de transportadores de membrana.

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas son responsables de un gran número de cambios tanto estructurales como funcionales y poseen un papel esencial en la regulación de su actividad biológica, aumentando al mismo tiempo la diversidad de especies proteicas presentes en las células (Cohen, 2002). Las proteínas ya sintetizadas pueden ser objeto de numerosas modificaciones químicas que conllevan, dependiendo de su naturaleza, efectos moduladores de su actividad, alteraciones en su localización subcelular, modificación de su capacidad para interactuar con otras proteínas o el marcaje específico para su degradación. Estas modificaciones suponen glicosilaciones, fosforilaciones, uniones lipídicas, marcaje con ubiquitina etc. que la célula interpretará como señal para la regulación de la respuesta celular (Johnson, 2009; Cheng *et al.*, 2011).

En el caso específico de la membrana plasmática, la regulación postraduccional juega un papel fundamental en el control de las proteínas transportadoras que forman parte de ella en respuesta a diferentes circunstancias. La fosforilación y la ubiquitinación suponen dos mecanismos de control esenciales, el primero implicado en la modulación de la actividad de las proteínas transportadoras y el segundo por suponer la señal que desencadena la endocitosis de proteínas transportadoras dañadas o con defectos de plegamiento, así como la retirada de las mismas en respuesta a cambios ambientales. A continuación se procederá al análisis de estos dos tipos de modificaciones postraduccionales haciendo hincapié, sobretodo, en la ubiquitinación y en los mecanismos que la envuelven.

3.1. Fosforilación

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales mejor entendidas y caracterizadas en eucariotas y está implicada en la regulación de casi cada aspecto de la vida de las células, como la regulación del metabolismo, la transcripción, el ciclo celular o la apoptosis. La anexión de un grupo fosfato procedente del ATP a un residuo de serina, treonina o tirosina está catalizado por las proteínas quinasas, y el efecto estructural que esta modificación postraduccional origina ha sido descrito para diferentes proteínas (revisado en Johnson, 2009). Este fenómeno puede ser contrarrestado por la acción de las proteínas fosfatasas. El nivel de fosforilación de cierto residuo, en cierta proteína, en un determinado momento y en determinadas condiciones es el resultado de la actividad de quinasas y fosfatasas, que deben estar estrictamente reguladas para generar los patrones de fosforilación adecuados a cada momento celular.

En *S. cerevisiae* se han descrito dos mecanismos generales de cómo la fosforilación afecta a la estructura de una proteína diana, y como consecuencia a su función. En primer lugar modifica la carga electrostática de la proteína (Strickfaden *et al.*, 2007), y en segundo lugar la fosforilación induce un cambio conformacional en la estructura de la proteína, proceso similar al que se produce con una regulación alostérica dada la reorganización que se produce en los átomos componentes de la molécula (Goodey y Benkovic, 2008). Algunos de los procedimientos para el análisis del

efecto de la fosforilación en la función de las proteínas incluyen métodos de análisis *in vitro* de actividad (Fosset *et al.*, 1971), ensayos de localización subcelular de proteínas (Smith y Rutter, 2007) o la identificación de la participación en complejos proteicos (Yachie *et al.*, 2011). Por lo tanto, el efecto de la fosforilación es descrito, por lo general, más como un impacto medible en la función de la proteína que sobre la estructura de la misma.

De entre las proteínas dianas de fosforilación, por ejemplo, encontramos 9 enzimas centrales en el metabolismo del carbono (Gph1, Pfk26, Fbp1, Pda1, Nth1, Cdc9, Gsy2, Hxk2 y Ugp9) cuya fosforilación activa o inactiva su función, cambia la localización de la propia enzima o supone una señal para su posterior degradación (revisado en Oliveira y Sauer, 2011). Entre el gran número de proteínas que se ven reguladas directamente por fosforilación, se encuentran algunos transportadores de membrana como el antiportador Na^+/H^+ , Nha1, el canal de potasio Tok1 (Proft y Struhl, 2004), los transportadores de aminoácidos Bap2 y Gap1 (Omura y Kodama, 2004; Stanbrough y Magasanik, 1995), la permeasa de uracilo Fur4 (Marchal *et al.*, 1998) y la bomba de protones Pma1 (Eraso *et al.*, 2006; Lecchi *et al.*, 2007). En el caso de esta última, y por su importante papel en la modulación del balance iónico y en la toma de nutrientes, la actividad electrogénica de Pma1 tiene que ser cuidadosamente regulada.

La glucosa tiene un efecto importante en la regulación de esta ATPasa, incrementando su V_{\max} y disminuyendo su K_m (Serrano, 1983). En estudios iniciales se sugirió la regulación a corto plazo de Pma1 a través de fenómenos de fosforilación de residuos de serina y treonina en su cola C-terminal (Portillo *et al.*, 1991), ya que mutaciones que afectaban a los residuos Ser899 y Thr912 eliminaban los cambios de actividad dependientes de glucosa. Posteriormente, se demostró que la quinasa Ptk2, perteneciente a la familia Npr1/Hal5, era la responsable de la fosforilación del residuo Ser899 que originaba la activación de Pma1 (Eraso *et al.*, 2006). Igualmente se ha descrito que los residuos Ser911 y Thr912 son dianas de fosforilación en respuesta a glucosa (Lecchi *et al.*, 2007). Por otra parte, la fosforilación del residuo Ser507 por la quinasa CK1 ha sido relacionada con la disminución de la actividad de Pma1 (Estrada *et al.*, 1996), poniendo de manifiesto que la fosforilación específica de ciertos residuos puede suponer el incremento o la disminución de su actividad. Adicionalmente, otras quinasas como Ptk1 o Hrk1 han sido propuestas como reguladoras directas o indirectas de Pma1 (Goossens *et al.*, 2000). Mediante la utilización de herramientas *in silico*, se ha descrito a la quinasa Pkc1 como posible reguladora de Pma1 en un estudio donde se relaciona actividad de Pma1 y señalización por calcio (Pereira *et al.*, 2008). Artículos recientes confirman como los residuos comprendidos entre la Lys889 y la Lys916 del extremo C-terminal de Pma1, región conocida por ser diana de fosforilaciones llevadas a cabo por quinasas, son fundamentales para la autoinhibición de su actividad en respuesta a ayuno de glucosa y para el correcto plegamiento de la proteína, al mismo tiempo que es diana de otras modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación (Mason *et al.*, 2014), modificación postraduccionales características de transportadores de membrana y que ha sido asociada con el estado de fosforilación (Horak, 2003; Iesmantavicius *et al.*, 2014).

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de los transportadores de iones está regulada principalmente a nivel postraduccionales y así lo confirman estudios a gran escala mediante

espectrometría de masas, que atribuyen 15 sitios de fosforilación para el transportador Nha1, 13 en el caso de Pma1, de los cuales algunos ya han sido descritos, y 7 para el transportador de potasio Trk1 (revisado en Ariño *et al.*, 2014). La existencia de un gran número de sitios de fosforilación sugiere mecanismos de regulación complejos, aunque las quinasas y fosfatasa implicadas continúan siendo, en la mayoría de los casos, desconocidas. En el caso de Trk1, se han descrito tanto quinasas como fosfatasa relacionadas con su regulación, aunque los residuos diana de modificación así como la acción directa o indirecta de estas proteínas sobre el transportador siguen siendo preguntas con muchos matices por resolver. Las quinasas Hal4 y Hal5 fueron descritas como activadoras del transporte de potasio modulando positivamente la actividad de Trk1 y Trk2 (Mulet *et al.*, 1999) aunque trabajos posteriores demostraron que la actividad de Trk1 no estaba controlada directamente por la fosforilación del transportador, sino que Hal4 y Hal5 tenían un papel indirecto en la estabilización del transportador en la membrana plasmática en respuesta a bajas concentraciones de potasio, previniendo su endocitosis y posterior degradación (Pérez-Valle *et al.*, 2007). Además, el papel de estas dos quinasas no es exclusivo para Trk1, puesto que se ha demostrado su implicación en la estabilidad de otros transportadores de variada naturaleza como Can1, Fur4 o Hxt1, quedando pendiente la caracterización del mecanismo molecular relacionado con esta regulación, así como las dianas de fosforilación de las quinasas Hal4 y Hal5.

Otro ejemplo que revela la implicación de eventos de fosforilación-desfosforilación en la regulación de la toma de potasio fue la identificación de Hal3 y Ppz1 (subunidad reguladora del complejo Hal3-Ppz1 y serina/treonina fosfatasa respectivamente) como reguladores del pH y del potasio intracelular a través de mecanismos que implican al transportador Trk1 (Yenush *et al.*, 2002). Con posterioridad se evidenció que Trk1 era fosforilado *in vivo*, que sus niveles de fosforilación aumentaban en mutantes *ppz1Appz2Δ* pudiendo tener un efecto en su actividad y que transportador y fosfatasa interactuaban físicamente (Yenush *et al.*, 2005), aunque la defosforilación directa de Trk1 por Ppz1 sigue sin estar demostrada. La proteína quinasa Sky1 también fue propuesta como posible reguladora de Trk1, aunque su función en la homeostasis de potasio y en la tolerancia a cationes sigue sin estar bien definida. Algunos estudios apoyan su papel en la modulación de Trk1 (Forment *et al.*, 2002), mientras que otros la implican en la regulación de otros canales como Tok1 y antiportadores como Nha1 y Kha1 (Erez y Kahana, 2002). Snf1, proteína quinasa activada en condiciones de estrés principalmente por fuente de carbono, también ha sido sugerida como reguladora de la entrada de potasio a través de Trk1 y Trk2. Mutantes *snf1* mostraron defectos en la activación del transporte de potasio, y mediante análisis genéticos se postuló que la versión no fosforilada (inactiva) de Snf1 podría tener un efecto en la activación de los sistemas de toma de potasio de alta afinidad en células que metabolizan glucosa, efecto que al mismo tiempo podría ser indirecto e implicar al activador transcripcional Sip4 (Portillo *et al.*, 2005). En último lugar, ha quedado demostrado que alteraciones en la señalización a través de la fosfatasa activada por calcio, calcineurina, afectan a la toma de potasio en un mecanismo que implica a la quinasa Hal5 y al transportador de potasio de alta afinidad Trk1 (Casado *et al.*, 2010).

A través de los ejemplos aquí expuestos, queda patente la importancia de los eventos de fosforilación/desfosforilación en la modulación de la actividad de algunas proteínas transportadoras de membrana y en la biología de las células en general, dando una idea de la complejidad de los mecanismos de regulación y de la cantidad de cambios a nivel bioquímico que se producen durante la adaptación de las células al medio en el cual se encuentran inmersas.

3.2. Ubiquitinación.

La modificación de proteínas por la unión covalente de ubiquitina es un mecanismo de regulación presente en todas las células eucariotas. La conjugación de ubiquitina a una proteína puede regular o modificar su estabilidad, su actividad o su localización subcelular y está vinculada con la degradación en el proteasoma, la reparación de DNA, las cascadas de señalización, la expresión génica, la endocitosis y el tráfico intracelular de proteínas de membrana (Ciechanover *et al.*, 1978; Hershko y Ciechanover, 1998; Hershko *et al.*, 2000).

La ubiquitina (Figura 7) es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada a nivel evolutivo y que tiene la capacidad de unirse covalentemente a residuos de lisina de proteínas diana. El enlace se establece entre un residuo de glicina en el extremo C-terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de una lisina presente en la proteína diana. La formación de este enlace requiere de tres reacciones secuenciales catalizadas en primer lugar por una enzima activadora de ubiquitina llamada E1, en segundo lugar por una enzima de unión a ubiquitina conocida como E2 y finalmente por la intervención de la enzima E3 ubiquitina

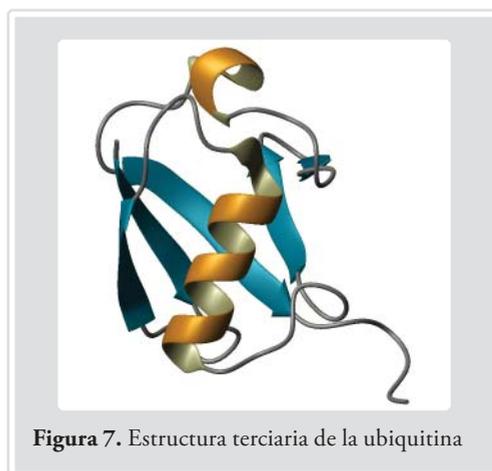


Figura 7. Estructura terciaria de la ubiquitina

ligasa (Figura 8). El proceso empieza con la formación de un enlace tioéster entre la glicina (G76) del extremo C-terminal de la ubiquitina y la enzima E1, reacción en la que se consume una molécula de ATP. Posteriormente la ubiquitina se transfiere por transtiolación a la enzima E2 y en última instancia será transferida a la proteína diana de ubiquitinación mediante la enzima E3, que establecerá su unión a una lisina mediante un enlace amida (Hershko y Ciechanover, 1998).

En general, existen grandes diferencias en el número de enzimas E1, E2 y E3 codificadas en los diferentes genomas. En levadura existe una enzima E1, once E2 y entre sesenta y cien E3 (Hicke *et al.*, 2005; Finley *et al.*, 2012) divididas en dos grandes grupos, las E3 ubiquitina ligasas HECT y RING. En el genoma humano se estima que existen dos E1, aproximadamente treinta E2 y más de seiscientos E3 (Li *et al.*, 2008). La razón por la cual existe tal diversidad de E3 ubiquitina

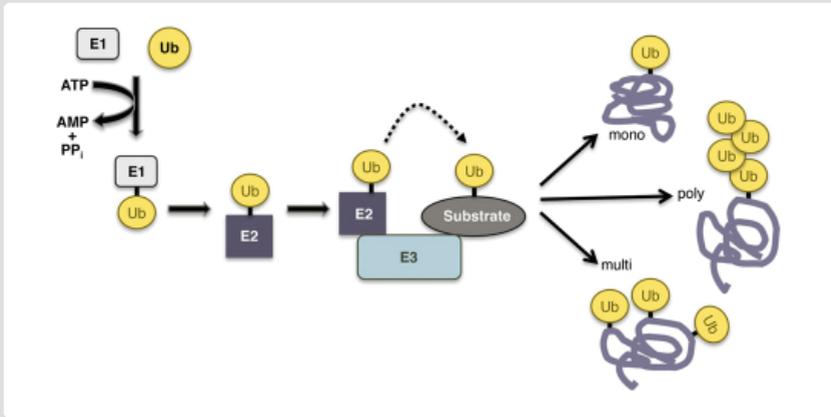


Figura 8. Ubiquitinación de proteínas. La ubiquitina es activada por una E1 ubiquitina ligasa en una reacción dependiente de ATP, transferida a una cisteína de la enzima E2 para ser posteriormente unida covalentemente a las proteínas sustrato, conjugación en la que participan las E3 ubiquitina ligasas. La unión de una sola molécula de ubiquitina genera proteínas monoubiquitinadas, aunque repetidas rondas de activación y conjugación pueden dar origen a proteínas poli- y multiubiquitinadas. Finley *et al.*, 2012.

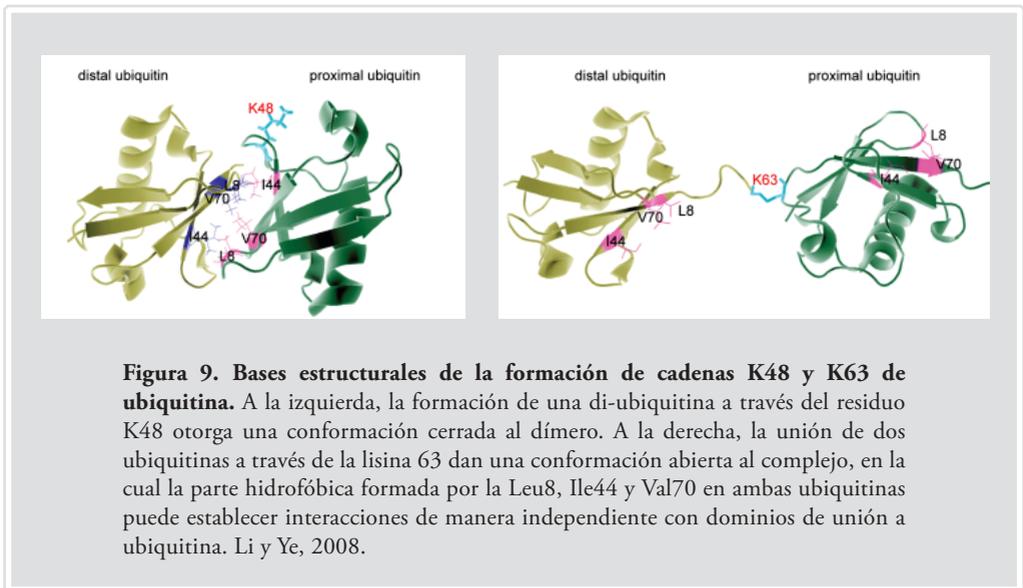
ligasas reside en el hecho de que estas proteínas están, durante la reacción de ubiquitinación, implicadas en la especificidad de la interacción con la proteína diana y por tanto implicadas en la ubiquitinación selectiva en respuesta a diversos estímulos ambientales.

La ubiquitinación es un proceso reversible cuya hidrólisis del enlace entre ubiquitina y sustrato puede ser catalizada por una familia de enzimas deubiquitininas (DUBs) (revisado en Hershko y Ciechanover, 1998). Estudios iniciales estimaron que en el genoma humano existían alrededor de 80 DUBs funcionales (Nijman *et al.*, 2005). Recientemente, utilizando métodos de análisis de secuencias se incrementó este número hasta alrededor de 125 genes en humanos y 25 en *S.cerevisiae* (Gao *et al.*, 2013). Futuros trabajos deberán establecer si todos estos genes son funcionales, al igual que deberá determinarse su especificidad por la ubiquitina o por moléculas relacionadas con la ubiquitina (p.e. SUMO).

3.2.1. Funciones y topología de la ubiquitinación.

Existen diferentes modos de ubiquitinación dependiendo del número y la forma en las que se enlazan los polipéptidos de ubiquitina a las proteínas diana. La monoubiquitinación supone la unión de una única molécula de ubiquitina a la proteína sustrato, mientras que la multiubiquitinación o la poliubiquitinación se caracterizan por la conjugación de más de una molécula de ubiquitina. La poliubiquitinación representa la señal característica de degradación

y se produce mediante enlaces isopeptídicos entre los residuos de lisina de una molécula de ubiquitina unida a la proteína sustrato y otras moléculas de ubiquitina libres y activadas, formando cadenas de ubiquitina con diferentes estructuras y funciones (Komander y Rape, 2012). A pesar de que en levadura y en células de mamífero se han observado todas las posibles uniones ubiquitina-ubiquitina que implican la formación de polímeros de ubiquitina a partir de uno de los siete residuos de lisina de su extremo N-terminal (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) (Kulathu y Komander, 2012), las cadenas más frecuentes de poliubiquitina son las que implican la unión de Ub entre los residuos de lisina 48 (Ub^{K48}) y aquellas formadas a partir de los residuos de lisina 63 (Ub^{K63}) (Figura 9). Las cadenas de Ub^{K48} están implicadas en dirigir la proteína diana al proteasoma para su degradación (Baboshina y Haas, 1996; Thrower *et al.*, 2000), mientras que las cadenas Ub^{K63} están implicadas en la reparación del DNA (Spence *et al.*, 1995), tráfico y localización intracelular de proteínas de membrana (vía endocítica) (Hicke, 1999; Mukhopadhyay y Riezman, 2007), respuesta a estrés (Arnason y Ellison, 1994), transducción de señal (Mukhopadhyay y Riezman, 2007; Sun y Chen, 2004) y síntesis ribosomal (Spence *et al.*, 2000; revisado en Li y Ye, 2008).



Por otra parte, la multiubiquitinación supone la unión de múltiples polipéptidos de ubiquitina a varias lisinasceptoras en una misma proteína diana. Como se ha visto con anterioridad, el marcaje de proteínas para la degradación en el proteasoma es la principal función de las cadenas de poliubiquitina, mientras que la multi- o la monoubiquitinación suelen tener funciones como la unión entre proteínas, cambios en la localización subcelular, la modulación de la actividad o el tráfico intracelular (Hicke 2001; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2009; Ziv *et al.*, 2011).

Varias permeasas de nutrientes son dianas de ubiquitinación en múltiples residuos de lisina por cadenas cortas de ubiquitina K63 en una reacción en la que se encuentra implicada la E3 ubiquitina ligasa de levadura, Rsp5 (Kim y Huijbregtse, 2000). Mientras que una única molécula

de ubiquitina es suficiente para promover la endocitosis, las múltiples monoubiquitinaciones y las cadenas cortas de K63 parecen acelerar el proceso de endocitosis, hasta el punto de que puede ser dependiente del sustrato (Galan y Haguenaer-Tsapis, 1997; Springael *et al.*, 1999). El transportador de lactato Jen1 es un ejemplo de endocitosis y organización en los cuerpos multivesiculares (MVB) estrictamente dependientes de cadenas K63 de ubiquitina (Paiva *et al.*, 2009).

3.3. Ubiquitinación de transportadores de membrana

Además de estar regulados a nivel transcripcional así como a nivel de actividad, un mecanismo adicional en la regulación de los transportadores de membrana es la endocitosis. La eliminación por endocitosis de proteínas de membrana cumple como mínimo dos funciones importantes: la retirada de proteínas dañadas o mal plegadas y la reorganización de la composición de proteínas presentes en la membrana plasmática en respuesta a cambios ambientales. Las proteínas internalizadas serán transportadas a compartimentos endocíticos desde donde serán o bien devueltas a la membrana a través de la ruta de reciclaje o bien entrarán a formar parte de los MVB para posteriormente ser liberados en la vacuola para su ulterior degradación. El proceso de endocitosis como regulador del tráfico de transportadores de membrana se lleva a cabo en todas las células eucariotas y los mecanismos implicados están esencialmente conservados desde la levadura *S.cerevisiae* hasta los mamíferos. La ubiquitinación supone la señal para la internalización de la mayoría de transportadores de membrana que son endocitados y en última instancia degradados en el orgánulo degradativo (lisosoma en mamíferos, vacuola en plantas y levaduras). Las E3 ubiquitina ligasas son las encargadas de llevar a cabo la reacción de ubiquitinación, y su función, junto a la de la ubiquitina, es importante no solo en la ruta endocítica sino también en la ruta secretora o en la ruta que conecta el aparato de Golgi con los MVB y el orgánulo de degradación (Figura 10).

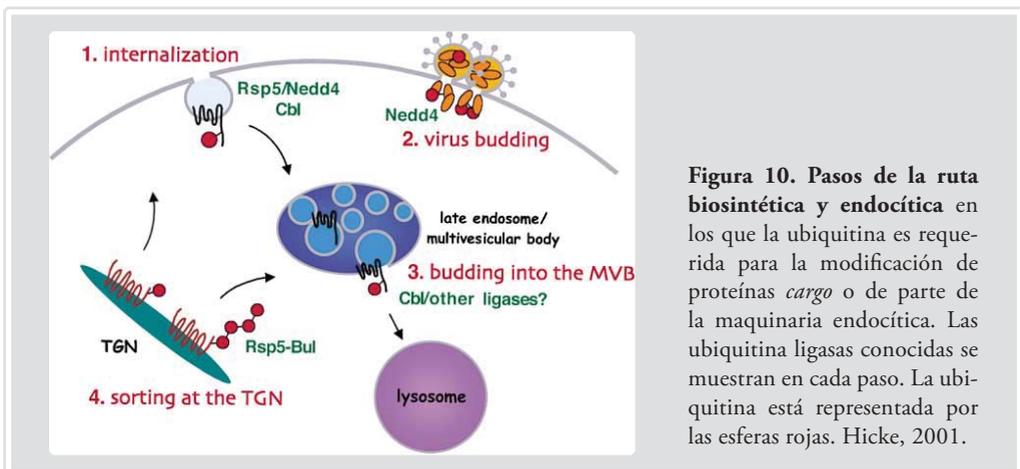


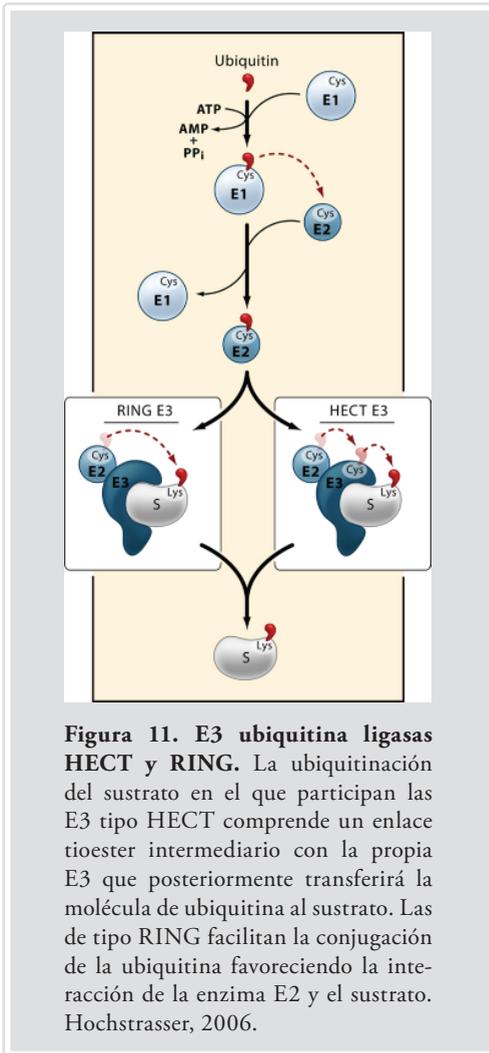
Figura 10. Pasos de la ruta biosintética y endocítica en los que la ubiquitina es requerida para la modificación de proteínas *cargo* o de parte de la maquinaria endocítica. Las ubiquitina ligasas conocidas se muestran en cada paso. La ubiquitina está representada por las esferas rojas. Hicke, 2001.

La levadura modelo *S. cerevisiae* proporcionó las primeras evidencias de la conexión entre la ubiquitinación de transportadores de membrana y endocitosis. En un estudio inicial se demostró como formas ubiquitinadas del transportador ABC de feromonas, Ste6, se acumulaban en la membrana plasmática en mutantes con deficiencias en la maquinaria de endocitosis (Kölling y Hollenberg, 1994). Además, mutaciones en Ste6 que implicaban la reducción de la ubiquitinación impedían su llegada a la vacuola, demostrando el papel de la ubiquitinación tanto en la endocitosis como en su degradación. Desde entonces, numerosos transportadores han demostrado ser regulados por endocitosis dependiente de ubiquitinación en respuesta a cambios en parámetros ambientales como el exceso de ligando, la disponibilidad de nutrientes o condiciones de estrés. Ejemplos de ello son la internalización de Gap1 después de la adición de amonio a células crecidas usando prolina como fuente de nitrógeno (Springael *et al.*, 1999), la endocitosis de los transportadores Gal2, Mal11 y Mal16 inducida por glucosa en células crecidas utilizando galactosa o maltosa como fuente de carbono (Horák y Wolf, 1997; Riballo *et al.*, 1995; Medintz *et al.*, 1996) o la endocitosis de los transportadores Zrt1 y Fur4 en respuesta al exceso de sus propios sustratos (Gitan *et al.*, 1998; Séron *et al.*, 1999).

3.4. Las E3 ubiquitina ligasas

Las E3 ubiquitina ligasas forman el mayor grupo de proteínas implicadas en ubiquitinación y son las encargadas de otorgar selectividad al proceso. Las E3 ubiquitina ligasas se dividen en dos familias en función de su estructura y de su mecanismo de acción: la familia de ligasas E3 RING (*Really Interesting New Gene*) y la familia HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) (Metzger *et al.*, 2012). La principal diferencia entre ambas familias reside en su actividad catalítica: mientras que las de tipo HECT poseen un residuo de cisteína conservado que sirve de intermediario entre la ubiquitina y la proteína diana, es decir, el dominio HECT posee actividad catalítica y es el responsable de la unión de la ubiquitina al sustrato específico, las de tipo RING no tienen función catalítica y únicamente actúan como plataforma molecular cuya función es la de acercar la proteína diana a la E2 posibilitando la reacción de conjugación entre la ubiquitina-E2 y el sustrato, al mismo tiempo que aporta especificidad a la interacción E2-sustrato (Figura 11).

Tomado en consideración las características de secuencia asociadas a las E3 ubiquitina ligasas, como los motivos RING, F-box o HECT, existen entre 60 y 100 E3 ligasas putativas en el genoma de levadura (revisado en Finley *et al.*, 2012). La mayoría de ellas pertenecen a la familia RING y solo cinco presentan dominios HECT: Hul4, Hul5, Tom1, Ufd4 y Rsp5. Entre éstas últimas, varios estudios han demostrado que la E3 ubiquitina ligasa involucrada en la ubiquitinación y endocitosis de la mayoría de las proteínas de membrana es la ubiquitina ligasa de la familia HECT, Rsp5 (Rotin *et al.*, 2000; Lauwers *et al.*, 2010), demostrando que en *S. cerevisiae* esta E3 ubiquitina ligasa tiene un papel clave en la regulación de este tipo de proteínas. El papel de Rsp5 en ubiquitinación y endocitosis de proteínas de membrana fue descrito por primera



vez para los transportadores Gap1 y Fur4 en un mutante que poseía una mutación en el promotor de *RSP5* que le confería niveles de expresión inferiores al 10% respecto a la cepa silvestre (Hein *et al.*, 1995). Posteriormente se ha demostrado que Rsp5 interviene en una amplia gama de eventos celulares dependientes de ubiquitina, lo que sugiere una importante contribución a la regulación de diferentes rutas biológicas (Gupta *et al.*, 2007; Rotin y Kumar, 2009).

3.5. Rsp5: estructura, función y dianas

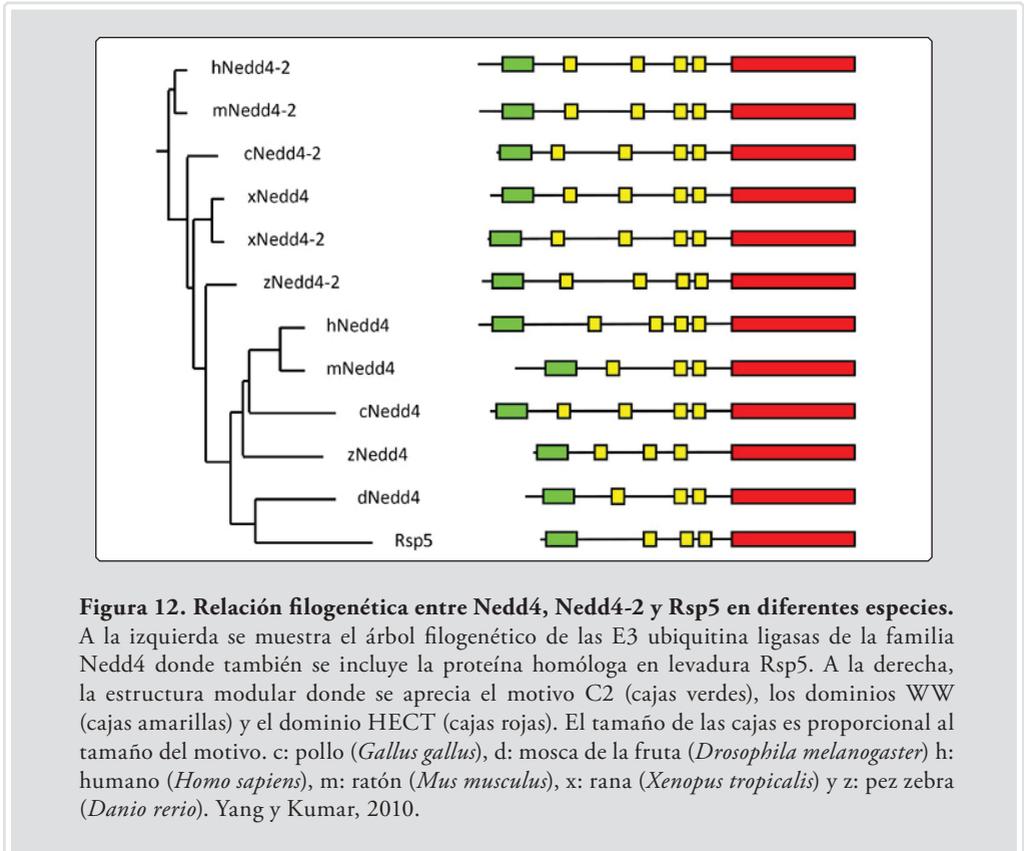
Rsp5 está codificada por el gen esencial *RSP5* (Huibregtse *et al.*, 1994) y junto con Nedd4, su ortólogo en mamíferos, es el miembro más caracterizado de una amplia familia de E3 ubiquitina ligasas. Esta familia esencial de E3 ubiquitina ligasas HECT está relacionada con diversas funciones celulares entre las que se encuentran la regulación transcripcional, el transporte núcleo-citoplasma de mRNA, la condensación de la cromatina y la síntesis de ácidos grasos insaturados (Beaudenon *et al.*, 1999; Hoppe *et al.*, 2000; Harkness *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003; Shcherbik *et al.*, 2004; Gwizdek *et al.*, 2005; Arnason *et al.*, 2005).

Rsp5 también está involucrada en la herencia mitocondrial y en la distribución de proteínas mitocondria-citoplasma, aunque en estos casos particulares los mecanismos no están bien definidos (Fisk y Yaffe, 1999; Zoladek *et al.*, 1997). Otra de las funciones importantes de Rsp5, y que comparte con su homólogo en humanos Nedd4-2, es la ubiquitinación de un gran número de proteínas de membrana (Belgareh-Touzé *et al.*, 2008) aspecto que centrará nuestro análisis posterior.

3.5.1. Estructura

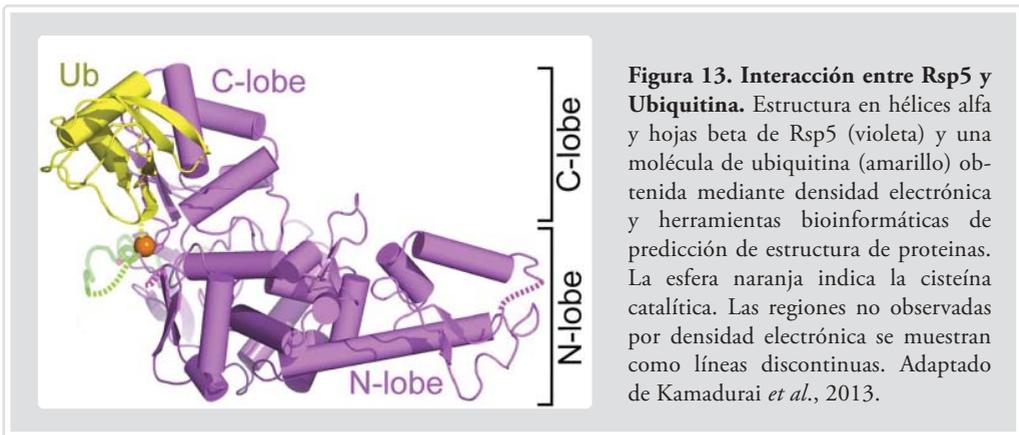
Todas las proteínas de la familia HECT comparten una estructura modular común muy conservada evolutivamente (Rotin y Kumar, 2009). Contienen un extremo N-terminal variable

donde está comprendido el dominio C2, de dos a cuatro repeticiones de los dominios WW en el centro (tres en Rsp5) y el dominio HECT en el extremo C-terminal (Figura 12).



El dominio C2 está muy conservado, contiene aproximadamente 120 aminoácidos y funciona como un dominio de unión a fosfolípidos, siendo por tanto el responsable de la asociación a membranas. La región central contiene de dos a cuatro repeticiones del dominio de interacción proteína-proteína, WW. Estos dominios están compuestos de 38-40 aminoácidos que se organizan en tres láminas β antiparalelas con una superficie de unión hidrofóbica (Macias *et al.*, 1996; Ranganathan *et al.*, 1997) y contienen dos residuos de triptófano invariables separados por 20-22 aminoácidos (Bork y Sudol, 1994). En la mayoría de casos, estos dominios WW se unen a secuencias ricas en prolina mediante la secuencia de reconocimiento consenso (L/P)PxY (motivos PY). También se ha descrito que los dominios WW son capaces de interactuar con residuos de fosfoserina o fosfotreonina (Lu *et al.*, 1999). Estos motivos tienen, por consiguiente, el potencial de ser mediadores de una amplia variedad de interacciones proteína-proteína (Jolliffe *et al.*, 2000). Los tres dominios WW de Rsp5 comparten función, es decir, tienen funciones redundantes ya que son requeridas mutaciones en los tres dominios para causar defecto en el crecimiento celular (Dunn y Hicke, 2001). Además, el dominio WW3 y el dominio catalítico HECT son suficientes para llevar a cabo las funciones esenciales de Rsp5 (Hoppe *et al.*, 2000).

El dominio catalítico HECT en el extremo C-terminal, está compuesto por 350 aminoácidos y es esencial para la actividad ubiquitina ligasa. El dominio HECT tanto de Nedd4 como de Rsp5 contiene un residuo de cisteína conservado que actúa como aceptor de la molécula de ubiquitina, siendo el responsable de la formación del enlace tioéster con la ubiquitina cedida por la enzima E2 afín y que posteriormente será transferida a la molécula sustrato (Huibregtse *et al.*, 1995). Estudios de la estructura de este dominio han permitido conocer aspectos bioquímicos básicos acerca de su actividad catalítica e interacción con la ubiquitina (Verdecia *et al.*, 2003; Kamadurai *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Kamadurai *et al.*, 2013). La figura 13 muestra la interacción entre la ubiquitina y Rsp5.



3.5.2. Función

Uno de los papeles más estudiados de Rsp5 es el que la implica en el tráfico intracelular de proteínas, en concreto en la internalización durante la endocitosis y la distribución de las proteínas *cargo* en los MVB (Hicke, 2001). Rsp5 participa en la ubiquitinación de las proteínas de membrana para promover su internalización y posterior clasificación en los MVB. También está implicada en la ubiquitinación de las proteínas transmembrana procedentes de biosíntesis (red trans del aparato de Golgi) y que tienen como destino subcelular la vacuola (Belgareh-Touzé *et al.*, 2008). (Figura 14)

Las principales dianas descritas de Rsp5 son por lo tanto tres clases de proteínas: los receptores de feromonas Ste2 y Ste3 que son objeto de endocitosis constitutiva inducida por ligando (Riezman, 1998), los transportadores de la familia ABC (ATP Binding Cassette) que incluye a Ste6, responsable de la secreción del factor a (Nelissen *et al.*, 1995) y las proteínas transportadoras de iones y nutrientes entre las que se encuentran la permeasa general de aminoácidos Gap1 (Springael *et al.*, 1999), el transportador de hexosas Hxt6/7 (Krampe *et al.*, 1998) o el transportador de zinc Zrt1 (Gitan *et al.*, 1999). La H⁺-ATPasa Pma1 también se encuentra regulada a través de ubiquitinación dependiente de Rsp5, pero en este caso como parte del control de calidad del aparato de Golgi en respuesta a una isoforma de Pma1 mal plegada (Pizzirusso y Chang, 2004). En la tabla 2 se muestran algunas de las permeasas reguladas por endocitosis.

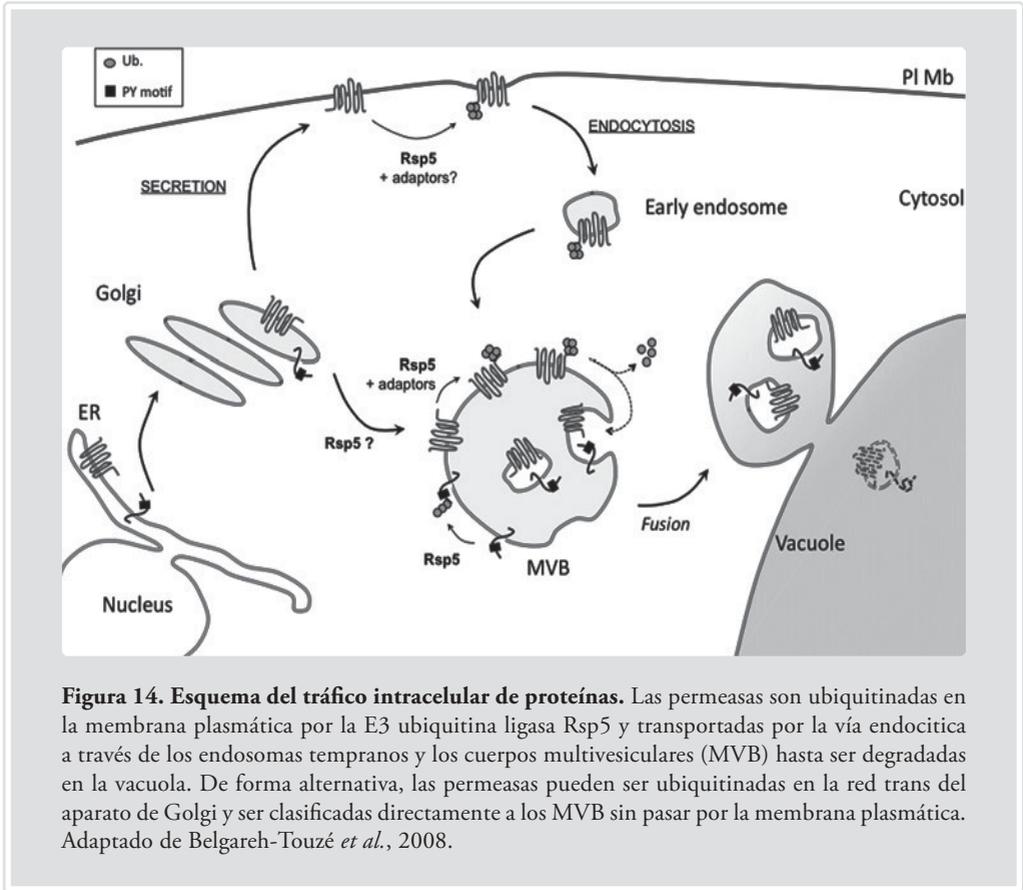


Figura 14. Esquema del tráfico intracelular de proteínas. Las permeasas son ubiquitinadas en la membrana plasmática por la E3 ubiquitina ligasa Rsp5 y transportadas por la vía endocítica a través de los endosomas tempranos y los cuerpos multivesiculares (MVB) hasta ser degradadas en la vacuola. De forma alternativa, las permeasas pueden ser ubiquitinadas en la red trans del aparato de Golgi y ser clasificadas directamente a los MVB sin pasar por la membrana plasmática. Adaptado de Belgareh-Touzé *et al.*, 2008.

Tabla 2. Permeasas y sus vías de regulación. Se muestran las E2 y E3 ubiquitina ligasas implicadas en la maquinaria de ubiquitinación y los estímulos frente a los cuales se induce la endocitosis de diferentes proteínas de membrana. Adaptado de Horák, 2003.

Proteína	Función	E2	E3	Modo de endocitosis/ degradación	Referencias
Ste2	Receptor del factor α	Ubc1/4/5	Rsp5	Inducida por sustrato y constitutiva	Hicke y Riezman, 1996; Dunn y Hicke, 2001.
Ste3	Receptor del factor a	Ubc4/5		Inducida por sustrato y constitutiva	Roth y Davis, 2000.
Ste6	Transportador del factor a	Ubc4/5		Constitutiva	Koelling y Hollenberg, 1994.
Pdr5	Transportador implicado en resistencia a drogas.			Constitutiva	Egner y Kuchler, 1995.

Proteína	Función	E2	E3	Modo de endocitosis/ degradación	Referencias
Mall1	Transportador de maltosa	Ubc4/5	Rsp5	Inducida por glucosa en ayuno de nitrógeno	Lucero <i>et al.</i> , 1997; Lucero <i>et al.</i> , 2000.
Mal61	Transportador de maltosa	Ubc1/4/5	Rsp5	Inducida por glucosa en ayuno de nitrógeno	Medintz <i>et al.</i> , 1998
Gal2	Transportador de galactosa	Ubc1/4/5	Rsp5	Inducida por glucosa en ayuno de nitrógeno	Horak y Wolf, 1997; Horak y Wolf, 2001.
Hxt6/7	Transportadores de glucosa		Rsp5	Inducida por glucosa en ayuno de nitrógeno	Krampe <i>et al.</i> , 1998
Fur4	Transportador de uracilo		Rsp5	Constitutiva y inducida por condiciones adversas	Galan y Haguenaer, 1997.
Gap1	Transportador general de aminoácidos		Rsp5	Inducida por amonio, glutamato y etanol.	Springael <i>et al.</i> , 1999; Shiga <i>et al.</i> , 2014
Tat2	Transportador de triptófano		Rsp5	Inducida por ayuno de nitrógeno o rapamicina	Beck <i>et al.</i> , 1999
Bap2	Transportador de aminoácidos		Rsp5	Constitutiva e inducida por fuentes de nitrógeno pobres o rapamicina	Omura <i>et al.</i> , 2001
Zrt1	Transportador de zinc	Ubc4/5	Rsp5	Inducida por sustrato	Gitan <i>et al.</i> , 1998
Alr1	Transportador de magnesio			Inducida por sustrato	Graschopf <i>et al.</i> , 2001
Smf1	Transportador de manganeso			Inducida por el metal de modo Bsd2 dependiente	Liu <i>et al.</i> , 1997
Pho84	Transportador de fosfato			Inducida por ayuno de fosfato	Martinez <i>et al.</i> , 1998

El homólogo de Rsp5 en mamíferos, Nedd4-2, está involucrado en la regulación de algunas proteínas transportadoras de cationes alcalinos como el transportador de sodio ENaC, catalizando su ubiquitinación que supondrá posteriormente su degradación en el lisosoma (Snyder *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2008; Boase *et al.*, 2011). En levadura esta función no ha sido abordada plenamente, aunque algunos datos indican que Rsp5 podría tener también un papel en la regulación de los transportadores de cationes alcalinos (revisado en Mulet *et al.*, 2013). Concretamente, nuestros datos apuntan a que el transportador de potasio Trk1 es diana de ubiquitinación (Perez-Valle, Llopis-Torregrosa y Yenush, datos no publicados) y anteriormente se demostró que entre los mecanismos de regulación de este transportador se encuentra la endocitosis (Pérez-Valle *et al.*, 2007). Esto invita a plantear la muy probable relación de causa-efecto a pesar de que los demás integrantes del complejo que participan en la reacción de ubiquitinación estén aún por esclarecer.

Como ya mencionamos anteriormente, Rsp5 contienen motivos WW que interaccionan directamente con los motivos PY de las proteínas sustrato. Sin embargo, muchas de las moléculas

INTRODUCCIÓN

cargo, incluidas numerosas permeasas, no disponen de este motivo consenso de interacción. En este tipo de casos, la interacción de Rsp5 con la proteína diana de ubiquitinación está medida por proteínas adaptadoras, entre ellas las proteínas ART de las que hablaremos a continuación.

4. Adaptadores del Tráfico Relacionados con Arrestinas: la familia ART.

Tal como se ha descrito, la ubiquitinación es fundamental como mecanismo regulador de las proteínas de membrana, y Rsp5 es la responsable de la ubiquitinación de un gran número de ellas. Rsp5 reconoce a sus proteínas diana mediante la interacción de sus motivos WW con un motivo PY. Sin embargo, gran parte de los transportadores de membrana reguladas por Rsp5, como por ejemplo Fur4 o Gap1, no contienen en su secuencia el motivo PY necesario para que dicha interacción se establezca y se pueda producir el marcaje de la proteína a endocitar o *cargo*, lo que sugiere la posibilidad de que Rsp5 requiera adaptadores específicos que medien la interacción entre Rsp5 y los sustratos que no presenten el dominio de reconocimiento PY en su secuencia. Asimismo, el hecho de que en el complejo de ubiquitinación participen adaptadores específicos explica cómo una única E3 ubiquitina ligasa puede reconocer un gran número de sustratos distintos en respuesta a estímulos diferentes.

Las conocidas β -arrestinas se caracterizan por su gran versatilidad al interactuar con cientos de subtipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), numerosas proteínas implicadas en señalización, componentes de la maquinaria de internalización así como con elementos del citoesqueleto incluyendo microtúbulos y centrosomas (revisado en Gurevich y Gurevich, 2013). Además existe una familia de proteínas que comparte con estas β -arrestinas la estructura de plegamiento del dominio arrestina (Alvarez, 2008). Estas proteínas, denominadas en muchas ocasiones como α -arrestinas, son la rama más antigua en la filogenia de las arrestinas, puesto que también están presentes en hongos filamentosos, levaduras y protistas (Patwari y Lee, 2012). En humanos se expresan seis α -arrestinas, aunque su función molecular es aún poco conocida. A lo largo de los siguientes apartados se analizarán más en detalle las características y función de esta familia de proteínas en levadura.

En mamíferos, las proteínas tipo arrestina intervienen de manera general en la endocitosis y regulación negativa de diversas familias de proteínas de membrana, siendo intermediarios clave en la homeostasis de las mismas (Lefkowitz *et al.*, 2006), ya que fomentan el reclutamiento de los factores de endocitosis a través de su unión a la proteína de membrana (Moore *et al.*, 2007). El descubrimiento en levadura de una proteína, posteriormente denominada Art1, que actuaba como regulador específico de cargo en la endocitosis, que era capaz de asociarse a Rsp5 y que contenía un corto motivo aminoacídico altamente conservado en los miembros de la familia de arrestinas, condujo a buscar en el genoma de este organismo modelo otras proteínas poseedoras de dichos motivos conservados. Mediante la herramienta de alineamiento MAST (Motif alignment and Search Tool) (Lin *et al.*, 2008), se descubrieron nueve proteínas incluyendo la ya descubierta (Art1-Art9) que, a pesar de no mostrar una fuerte homología de secuencia con las arrestinas, contenían un motivo o elemento de plegamiento que posteriormente se denominó motivo arrestina. Con posterioridad se identificó Art10, que a pesar de ser muy distinto a los otros nueve componentes de la familia, presentaba las características para ser un adaptador de Rsp5: poseer motivos PY y un dominio similar al arrestina (Nikko y Pelham, 2009). A partir de entonces se las denominó Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina o familia ART, y debido a la similar organización de los dominios de estas proteínas respecto a las arrestinas de mamíferos y a su capacidad para unirse a la ubiquitina ligasa Rsp5 (Lin *et al.*, 2008).

Las similitudes tanto estructurales como funcionales atribuidas a estas proteínas en comparación con las de eucariotas superiores sugieren que la familia ART podría suponer un sistema de control de calidad en la membrana plasmática, marcando las proteínas dañadas o mal plegadas para su posterior degradación en la vacuola. De esta forma, las proteínas ART podrían participar en la remodelación de las proteínas de la superficie celular en respuesta a cambios ambientales (Lin *et al.*, 2008). Además de la familia ART, existen otros adaptadores de Rsp5 que intervienen en el tráfico vacuolar y/o en la endocitosis de proteínas de la membrana plasmática y que del mismo modo son portadores de motivos PY. Se estima que existen hasta dieciocho proteínas adaptadoras de Rsp5 (Lawers *et al.*, 2010), lo que añade un importante nivel de regulación al proceso de ubiquitinación, nivel que puede adquirir mayor complejidad si se toman en cuenta las diferentes localizaciones subcelulares en las que intervienen estas proteínas adaptadoras. Las proteínas Art1-Art10 desempeñan su función principalmente a nivel de membrana plasmática (Lin *et al.*, 2008; Nikko y Pelham, 2009; MacGurn *et al.*, 2011), mientras los adaptadores Bull1 y Bul2 actúan tanto a nivel de membrana plasmática como de trans-Golgi (Nikko y Pelham, 2009), donde se produce la clasificación de ciertas proteínas hacia la vía endosomal, el control de calidad de proteínas mal plegadas o el tráfico vacuolar (Hettema *et al.*, 2004; Soetens *et al.*, 2001). Otras proteínas adaptadoras de Rsp5, como Ear1, Ssh4, Bsd2, Tre1 y Tre2, se encuentran localizadas principalmente en endosomas (Liu *et al.*, 1997; Stimpson *et al.*, 2006; León *et al.*, 2008). El conjunto de estos datos señala que la ubiquitinación mediada por Rsp5 ocurre a lo largo de toda la vía endocítica (en la membrana plasmática y posteriormente en los MVB) pero a través de distintos adaptadores. Un ejemplo de esto es el transportador de manganeso Smf1, en cuya endocitosis dependiente de cadmio interviene Art2 mientras que en respuesta a exceso de sustrato es directamente enviado a la vacuola desde el Golgi, a través de la ubiquitinación Rsp5-dependiente en la que intervienen las proteínas adaptadoras Bsd2, Tre1 y Tre2 (Sullivan *et al.*, 2007; Nikko *et al.*, 2008). Otros ejemplos de permeasas en cuya regulación se requieren este tipo de adaptadores son Fur4, Gap1 o Tat2 entre otros, cuyos mecanismos de regulación serán analizados más adelante.

Por lo tanto, las proteínas adaptadoras de Rsp5, y especialmente la familia ART, son las que confieren especificidad a la ubiquitinación de proteínas de la membrana plasmática y contribuyen al mantenimiento de un correcto repertorio de proteínas en la superficie celular. Este aspecto las implica de manera significativa en el control de las interacciones entre la célula y el medio externo y en definitiva en la continuidad de la homeóstasis celular. En la siguiente tabla se muestran los componentes de la familia ART acompañados de sus diferentes identificaciones. A lo largo de este

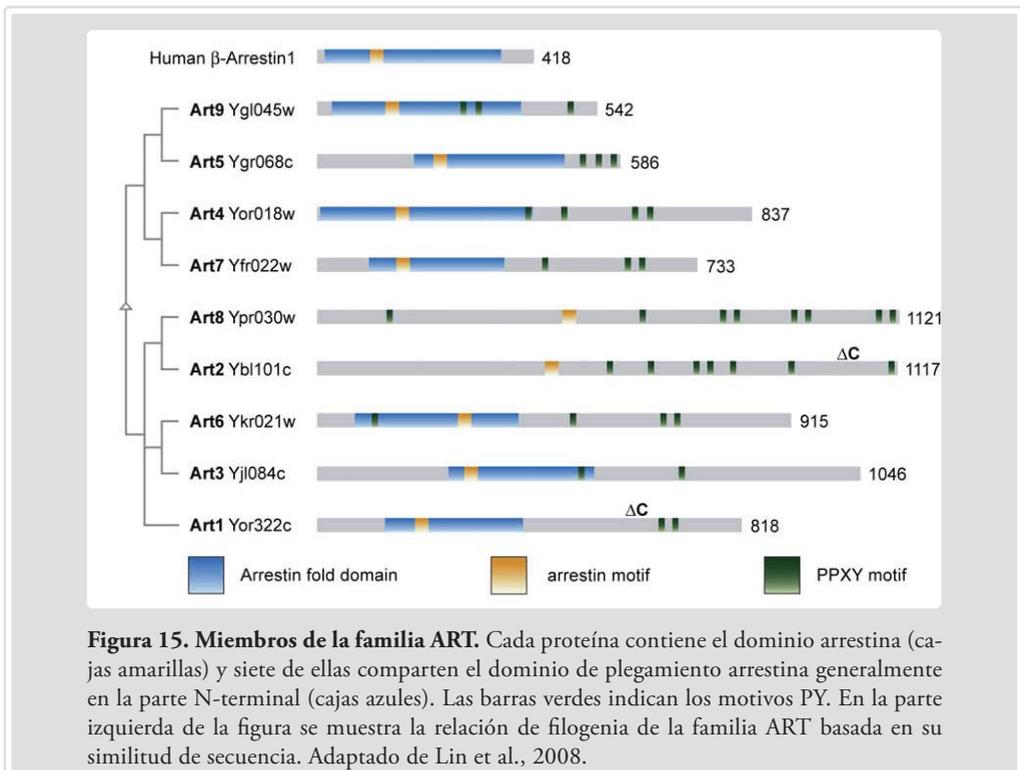
Tabla 3. Nomenclatura de los componentes de la familia ART de adaptadores de Rsp5. Se nombra las diferentes formas de hacer referencia a cada uno de sus miembros, incluyendo el nombre sistemático, el estándar y el alias. La nomenclatura que será utilizada en este trabajo corresponde con la tercera columna o alias.

Nombre sistemático	Nombre estándar	Alias
YOR322C	LDB19	ART1
YBL101C	ECM21	ART2
YJL084C	ALY2	ART3
YOR018W	ROD1	ART4
YGR068C	ART5	
YKR021W	ALY1	ART6
YFR022W	ROG3	ART7
YPR030W	CSR2	ART8
YGL045W	RIM8	ART9
YLR392C	ART10	

trabajo se hará referencia a ellos con la nomenclatura ART más el número atribuido dentro de la familia. (Tabla 3)

4.1. Características de la familia ART

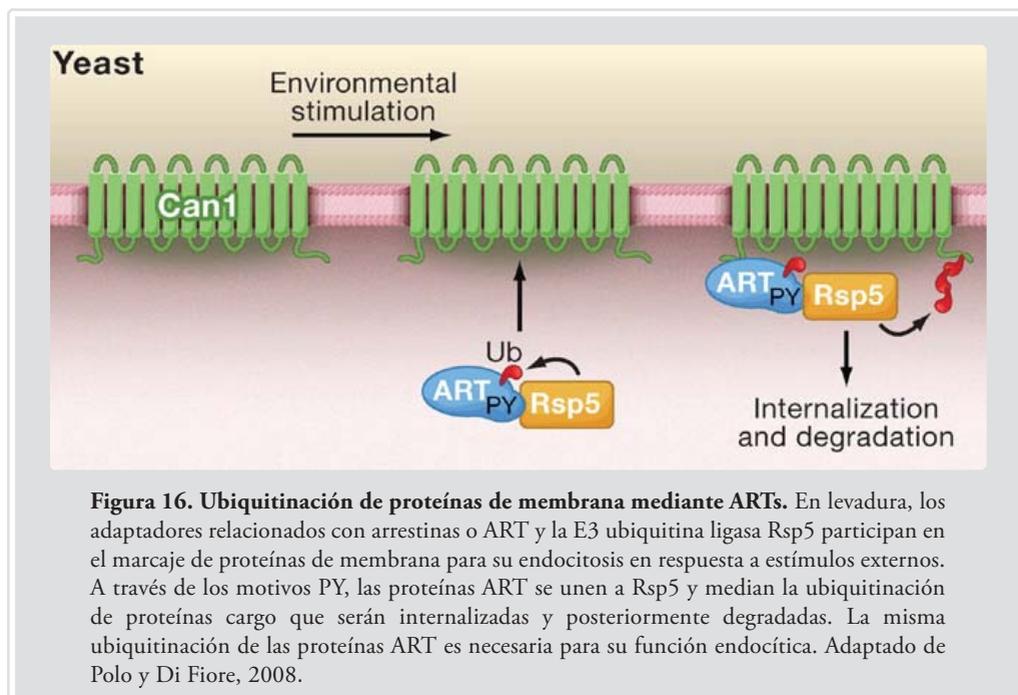
Tal como se ha descrito anteriormente, la familia de proteínas ART está compuesta por diez miembros en *S. cerevisiae* y su principal función es la de asegurar la especificidad en la reacción de ubiquitinación, en la cual interviene Rsp5 y que marcará a las proteínas *cargo* para su posterior internalización. Estas proteínas tienen una longitud comprendida entre los 500 y los 1200 aminoácidos y en todas ellas, a excepción de Art2 y Art8, se predijo la existencia de un dominio de plegamiento o *fold* tipo arrestina en su parte N-terminal. Además, la secuencia de todas estas proteínas contiene diversos motivos PY en la parte C-terminal, lo que sugirió la posibilidad de que actuaran como adaptadores de la E3 ubiquitina ligasa Rsp5 (Lin *et al.*, 2008), posibilidad que se basaba en estudios proteómicos anteriores donde se describía como todos los miembros de la familia ART, exceptuando Art5 y Art9, co-purificaban con Rsp5 a partir de extractos celulares de levadura (Andoh *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006). En la figura 15 se muestra cada uno de los miembros de la familia ART con sus dominios característicos.



4.2. Funciones de la familia ART

La función fundamental de esta familia es la de regular la ubiquitinación de proteínas *cargo* de la membrana plasmática en respuesta a estímulos específicos, del mismo modo que son consideradas como componentes del sistema de control de calidad encargado de marcar proteínas dañadas o mal plegadas para su degradación en la vacuola.

Las proteínas ART son reclutadas en la membrana plasmática, reconocen dominios citoplasmáticos de transportadores específicos y facilitan la unión de la ubiquitina ligasa Rsp5 en respuesta a distintas señales endocíticas, acontecimiento que supondrá la ubiquitinación de la proteína diana y posterior degradación (Lin *et al.*, 2008). Una de las características de las proteínas ART, y que comparten con las arrestinas de mamíferos, es que durante el proceso de marcaje de las proteínas *cargo* con ubiquitina, ellas mismas son sustratos de la ubiquitina ligasa (Shenoy *et al.*, 2001) (Figura 16) Este aspecto parece relacionar la necesidad de ubiquitinación de los adaptadores con su función endocítica (Gupta *et al.*, 2007), ya que la ubiquitinación podría ser necesaria para su correcta localización subcelular (Lin *et al.*, 2008).



Desde que se describió la familia ART, la regulación endocítica de numerosas permeasas ha demostrado ser dependiente de alguno o de varios de sus componentes. Cada miembro de la familia ART puede facilitar la ubiquitinación de diferentes transportadores así como un mismo transportador puede encontrarse regulado por diferentes ARTs, sin que esto suponga que exista redundancia entre adaptadores que regulan a una misma permeasa; un determinado transportador

requiere de un ART u otro dependiendo del estímulo que integre la célula, como el exceso de sustrato o algún tipo de estrés (Nikko y Pelham, 2009). En la tabla 4 se muestran diferentes permeasas y las proteínas adaptadoras involucradas en su endocitosis.

Como se puede observar en la tabla 4, se han descrito varias interacciones entre ARTs y permeasas. Ejemplo de ello son la regulación del transportador de inositol Itr1 mediada por Art5 en respuesta a inositol exógeno, la endocitosis del transportador de glucosa Hxt6 mediada por Art4 y Art8 en respuesta a glucosa o a ciclohexamida respectivamente o el transportador de triptófano Tat2 regulado por Art1 en respuesta a altas concentraciones de triptófano en el medio (Nikko y Pelham,

Tabla 4. Permeasas de levadura y proteínas adaptadoras de Rsp5 que regulan su endocitosis.

Nótese la participación de distintos adaptadores frente a un mismo estímulo o su especificidad dependiendo del transportador y del estímulo externo. Adaptado de Lauwers *et al.*, 2010

Permeasa (sustrato)	Condiciones de internalización y degradación en la vacuola	Adaptadores	Referencias
Can1 (arginina)	Ciclohexamida	Art1	Lin <i>et al.</i> , 2008
Ctrl (Cobre)	Exceso de sustrato	Bul1 y Bul2	Liu <i>et al.</i> , 2007
Fur4 (Uracilo)	Ciclohexamida Exceso de sustrato	Bul1, Bul2, Art1, Art2, Art8, Bsd2, Ear1, Ssh4 Bul1, Bul2, Art1, Art2, Art8 y Bsd2	Galan y Hagenauer-Tsapis, 1997; Nikko y Pelham, 2009; León <i>et al.</i> , 2008; Hein and André, 1997.
Gap1 (aminoácidos)	Amonio o exceso de sustrato	Bul1, Bul2, Ear1, Ssh4	Springael <i>et al.</i> , 1999; Soetens <i>et al.</i> , 2001; Helliwell <i>et al.</i> , 2001; León <i>et al.</i> , 2008.
Hxt6 (hexosas)	Ciclohexamida Exceso de sustrato	Art8 Art4	Nikko y Pelham, 2009; Beck y Hall, 1999.
Itr1 (inositol)	Exceso de sustrato	Art5, Bsd2	Nikko y Pelham, 2009.
Lyp1 (lisina)	Ciclohexamida Exceso de sustrato	Art2 Art1	Lin <i>et al.</i> , 2008; Nikko y Pelham, 2009.
Mup1 (metionina)	Exceso de sustrato	Art1	Lin <i>et al.</i> , 2008
Smf1 (cationes divalentes)	Exceso de sustrato Estrés	Bsd2, Trel, Tre2 Bsd2, Art2, Art8, Trel, Tre2, Ear1, Ssh4	Nikko y Pelham, 2009; Nikko <i>et al.</i> , 2008; Hettema <i>et al.</i> , 2004.
Tat2 (triptófano)	Cicloheximida Exceso de sustrato	Bul1, Bul2, Art2, Art8, Bsd2 Bul1, Bul2, Art1, Art2, Art8, Bsd2	Beck <i>et al.</i> , 1999; Umebayashi y Nakano, 2003; Nikko y Pelham, 2009.
Sit1 (ferroxiaminas)	Ausencia de sustrato	Ssh4, Ear1, Trel	León <i>et al.</i> , 2008
Jen1	Inducida por glucosa	Art4	Becuwe <i>et al.</i> , 2012
Ste2	Inducida por ligando	Art1, Art4, Art7	Alvaro <i>et al.</i> , 2014

2009). En la mayoría de los casos, solo se ha descrito la interacción genética entre transportador y arrestina (Lin *et al.*, 2008; Nikko y Pelham, 2009), aunque en algunos casos se ha podido evidenciar su interacción física, como la interacción entre el adaptador Art2 y el transportador de metales divalentes Smf1, o Art3 y la permeasa de ácido aspártico Dip5 (Hatakeyama *et al.*, 2010; Nikko *et al.*, 2008). A pesar de ello, queda por estudiar la localización subcelular donde se producen estas y otras interacciones proteína-proteína.

Como hemos visto, el adaptador Art1 es requerido para la endocitosis de diferentes permeasas como Fur4, Mup1, Lyp1 o Tat2 en respuesta a exceso de sustrato al mismo tiempo que diferentes adaptadores, Art1, Art2 y Art8 pueden participar en la endocitosis de Tat2 frente a este exceso de sustrato. La intervención de uno u otro adaptador viene definida por el tipo de respuesta a la que tenga que hacer frente la célula (Lin *et al.*, 2008). Esto significa que la especificidad de interacción entre ART y *cargo* no viene determinada solo por ellas mismas, sino que también existe una regulación de la interacción adaptador-*cargo* en respuesta a diferentes estímulos.

Algunos estudios manifiestan cómo otras modificaciones postraduccionales, como la fosforilación de las dianas de endocitosis en respuesta a estímulos específicos, cumplen un papel importante en la regulación del reconocimiento del *cargo*, ya que varias proteínas de membrana como Ste2 o Fur4 requieren fosforilación previa a su ubiquitinación e internalización (Hicke y Dunn, 2003; Dupré *et al.*, 2004). Del mismo modo, se ha descrito que la fosforilación de Smf1 es necesaria para la unión con Art2 (Nikko *et al.*, 2008), demostrando una vez más la importancia de esta modificación y sugiriendo que podría originar cambios conformacionales en los transportadores dejando más accesibles algunos residuos de lisina para la ubiquitinación (Belgareh-Touze *et al.*, 2008).

4.3. Regulación de la actividad de las proteínas ART.

Como se ha mencionado anteriormente, la familia de proteínas ART es diana de modificaciones postraduccionales que regulan su actividad como mecanismo de respuesta a cambios ambientales. Además de la ubiquitinación por Rsp5, otras modificaciones de esta familia de proteínas han sido descritas, siendo el principal mecanismo el proceso de fosforilación/desfosforilación.

Análisis proteómicos de fosforilación en levadura han demostrado que los componentes de la familia ART son ampliamente fosforilados (Albuquerque *et al.*, 2008), y que este fenómeno tiene efectos en su actividad. Ejemplo de ello son la inhibición de Art1 tras ser fosforilado por la quinasa Npr1 (MacGurn *et al.*, 2011) o la fosforilación de los adaptadores Bul1 y Bul2, también por Npr1, que genera sitios de unión a proteínas 14-3-3 con un efecto inhibitorio (Merhi y André, 2012). Por el contrario, el mecanismo de desfosforilación también ha sido descrito como mecanismo de activación de proteínas adaptadoras en determinados casos, como es la desfosforilación de Art4 dependiente de calcineurina para activar su papel en la endocitosis de Ste2 (Alvaro *et al.*, 2014)

o la de Art6 para estimular su función en el tráfico de Dip5 a la vacuola (O'Donell *et al.*, 2013). También ha sido demostrado que Art4 es inhibido por proteínas 14-3-3 en el mecanismo de endocitosis de Jen1, aunque en este caso en particular la proteína encargada de generar los sitios de unión Art4-14-3-3 es la quinasa Snf1 (Becuwe *et al.*, 2012). Por su relevancia a lo largo del presente trabajo, tanto la quinasa Snf1 como las proteínas 14-3-3 serán analizadas con más detalle a continuación.

4.3.1. Características de la quinasa Snf1

SNF1 se identificó como un gen necesario para la expresión de genes reprimidos por glucosa y para el crecimiento en sacarosa como fuente de carbono. A nivel de proteína mostró tener la habilidad de transferir un grupo fosfato desde el ATP a residuos de serina y treonina en un ensayo de autofosforilación *in vitro*, por lo que se le atribuyó el papel de proteína quinasa (Celenza y Carlson, 1986).

Snf1 es la subunidad catalítica y el miembro fundador de la familia de quinasas activadas por AMP (AMPKs) muy conservada en eucariotas, habiéndose encontrado homólogos de Snf1 tanto en plantas como en mamíferos (Alderson *et al.*, 1991; Mitchelhill *et al.*, 1994). En este último grupo se denomina a esta quinasa como AMPK, y está implicada en la respuesta a estrés originada por bajos niveles de ATP (Corton *et al.*, 1994). AMPK es activada en ratios elevados AMP:ATP y estimula la toma de glucosa, la oxidación de ácidos grasos, inhibe reacciones anabólicas e incrementa reacciones que generan ATP (Hardie *et al.*, 1998). Por ello, AMPK es considerada como un guardián de la homeostasis de energía de las células, promoviendo su producción y reduciendo su demanda cuando los niveles de la misma se agotan.

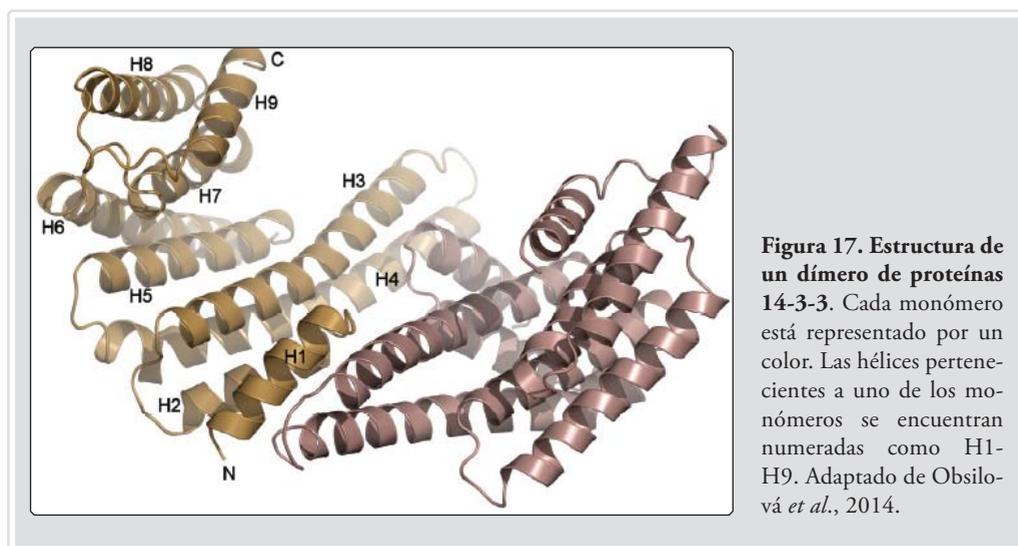
En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la quinasa Snf1 tiene funciones similares, aunque es activada por bajos niveles de glucosa más que por la carga energética de la célula. Esto refleja la tendencia de las células de levadura a evaluar la suficiencia de nutrientes predominantemente a través de la percepción directa de glucosa en lugar de hacerlo a través del metabolismo de la misma (revisado en Broach, 2012).

Al igual que otros miembros de la familia de quinasas AMPK, el complejo SNF1 es un heterotrímero compuesto por la subunidad catalítica Snf1 (α), la subunidad reguladora Snf4 (γ) y una de las tres subunidades β , Gal83, Sip1 o Sip2, que tienen una función estructural en el complejo al mismo tiempo que determinan su localización. La activación del complejo SNF1 se produce como resultado de la fosforilación del residuo de treonina 210 (Thr210) en el *loop* de activación de Snf1, fosforilación llevada a cabo por una de las tres quinasas redundantes Elm1, Tos3 o Sak1, en respuesta a bajos niveles de glucosa (Hong *et al.*, 2003), aunque otros estreses como el pH alcalino, agentes oxidativos, niveles elevados de clouro de sodio o ayuno de nitrógeno también desencadenan su activación (revisado en Broach, 2012). La acción de las tres quinasas encargadas de la activación del complejo SNF1 es contrarrestada por la proteína fosfatasa 1, conocida como Glc7, en conjunción con la subunidad Reg1 encargada de aportar especificidad

(Tu y Carlson, 1995). Bajos niveles de glucosa corresponden con el incremento de la fosforilación del residuo Thr210 y un aumento en la actividad del complejo SNF1 (McCartney and Schmidt, 2001), mientras que niveles elevados de glucosa promueven la desfosforilación de este mismo residuo que promoverá la pérdida de actividad del complejo. Por lo tanto, el complejo SNF1 actúa como un sensor de los niveles de glucosa en la célula, y de su estado de activación dependen numerosas rutas de señalización, entre ellas la ruta implicada en el endocitosis del transportador de lactato Jen1 (Becuwe *et al.*, 2012) o en el tráfico intracelular de Hxt6, como se expone más adelante en este estudio.

4.3.2. Características de las proteínas 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 forman una familia de proteínas ácidas y muy conservadas con una masa de alrededor de 30 KDa y con capacidad de formar homo y heterodímeros estables. Cada monómero consta de nueve hélices alfa antiparalelas y el dímero de proteínas 14-3-3 posee una forma característica en forma de U (Figura 17), formando una ranura que puede acomodar dos péptidos de las proteínas a las que se unen (Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995)



La primera función que se le atribuyó a estas proteínas fue la activación de la síntesis de neurotransmisores (Ichimura *et al.*, 1987) aunque con posterioridad se descubrió que son capaces de unirse a numerosas proteínas. En la actualidad, se han descrito centenares de proteínas de diversos organismos eucariotas capaces de interactuar con las proteínas 14-3-3, proteínas involucradas en casi cualquier proceso celular (revisado en van Heusden, 2009). En muchos casos, aunque no en todos, las proteínas 14-3-3 se unen a residuos de fosfoserina o fosfotreonina en sus dianas de interacción, y este fenómeno puede tener principalmente tres consecuencias; el cambio conformacional de la proteína a la que se unen originando la activación o la inhibición

de su actividad, la oclusión física de una estructura o de una secuencia específica, o el anclaje de proteínas que se encuentran cercanas (revisado en Obsil y Obsilová, 2011).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee dos genes que codifican proteínas 14-3-3, *BMH1* y *BMH2* (van Heusden *et al.*, 1992; van Heusden *et al.*, 1995). La disrupción de uno de los genes *BMH* tiene poco efecto en la viabilidad de las células, pero la disrupción simultánea de ambos genes es letal para las células de levadura. A lo largo de las dos últimas décadas, numerosas publicaciones han descrito la interacción de las proteínas 14-3-3 con otras proteínas celulares. Más recientemente los conocimientos acerca de esta familia de proteínas se han visto favorecidos gracias al incremento de estudios genómicos y proteómicos a gran escala que empiezan a revelar las redes moleculares en las que se encuentra implicada esta familia de proteínas (revisado en van Heusden, 2009). Una vez más, las rutas de señalización implicadas en la endocitosis y en el tráfico de transportadores de membrana han mostrado estar reguladas, en parte, por esta familia de proteínas.



Objetivos

Con la información revisada en la sección anterior, la levadura *S. cerevisiae* demuestra tener un complejo sistema de proteínas adaptadoras de Rsp5, pertenecientes a la familia ART, que intervienen en rutas de señalización y en la respuesta a estímulos externos, con la finalidad de asegurar la especificidad de la interacción de Rsp5 con los numerosos transportadores de membrana que asegurarán su correcta ubiquitinación y degradación en función de las condiciones ambientales. En la presente tesis doctoral se intentará establecer un vínculo entre el transportador de potasio Trk1 y las proteínas ART, se estudiará el efecto de variaciones en la homeóstasis del potasio sobre otros transportadores de iones como Pma1 y se procederá a la caracterización de la ruta de señalización Art4-Snf1-14-3-3 y al análisis de su implicación en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6. Del mismo modo, se estudiará la participación de otras proteínas de la familia ART, como Art7, en la regulación de este transportador y la implicación, tanto de Art4 como de Art7, en la regulación de otras permeasas de la familia HXT como Hxt1 y Hxt3.

Con este fin, los objetivos propuestos para la realización de este trabajo se presentan a continuación:

- 1 - Examinar mecanismos de regulación postraducciona l de transportadores de iones.
- 2 - Analizar la interacción de la proteína quinasa Snf1 y las proteínas 14-3-3 con la familia de proteínas ART y caracterizar los dominios implicados en las interacciones que se produzcan entre ellas.
- 3 - Estudiar la posible interacción física entre el transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 y la proteína adaptadora Art4, así como analizar el posible efecto de Snf1 y Bmh2 en la formación del complejo Hxt6-Art4.
- 4 - Analizar la relevancia fisiológica de las deleciones de algunos miembros de la familia ART y su efecto sobre la regulación de varios transportadores de la familia HXT.



Materiales y métodos

1. Material biológico y condiciones de crecimiento

1.1 Condiciones de crecimiento de levadura

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas a lo largo de este trabajo se muestran en la Tabla 5. Las células de levadura se crecieron a 28°C en medio YPD (2% glucosa, 2% peptona bacteriológica, 1% extracto de levadura), en medio sintético SD (2% glucosa o 2% rafinosa, 0,7% yeast nitrogen base, 50 mM ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris) o en medio mínimo MYRaf (2% rafinosa, solución de sales, solución de elementos traza y solución de vitaminas (Zonneveld, 1985)) En el caso del medio SD y MYRaf se añadieron aminoácidos y bases púricas y pirimidínicas de acuerdo con las necesidades de cada cepa (30 µg/mL adenina, 100 µg/mL triptófano, 30 µg/mL histidina, 100 µg/mL leucina, 30 µg/mL metionina, 30 µg/mL uracilo). Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar.

1.1.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos)

Los ensayos de crecimiento de las cepas en estudio se realizó utilizando diluciones seriadas de cultivos líquidos saturados. Aproximadamente 3 μL de cada dilución fueron transferidos con la ayuda de un replicador (Sigma) a placas de medio sólido con las diferentes condiciones a estudiar. Posteriormente se incubaron las placas entre 2 y 5 días a 28°C. En el análisis del crecimiento se tuvieron en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observa crecimiento como el tamaño de colonia.

1.1.2. Crecimiento en medio líquido

Las células de levadura se inocularon en medio selectivo suplementado con aminoácidos, bases nitrogenadas y la fuente de carbono indicada (glucosa 2% o rafinosa 2%). Se incubaron a 28°C en agitación constante a 200 rpm hasta que alcanzaron una DO_{600} 0.4-0.6. Las densidades ópticas de los cultivos se midieron usando un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotomer plus). En el caso en el que dichos cultivos requirieran de algún tratamiento, el mismo se iniciaba en el rango de densidades ópticas mencionado anteriormente.

1.2. Condiciones de crecimiento de bacterias

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* fue la utilizada como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. Las células bacterianas se crecieron a 37°C en medio de Luria-Bertani (LB) compuesto por 0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de NaCl ajustando el conjunto a pH 7. Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar. Para la selección de cepas portadoras de plásmidos se añadió ampicilina o kanamicina al medio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 5. Cepas de levadura utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741	Mat a <i>ura3-0 leu2-0 his3-1 met15-0</i>	EUROSCARF
<i>art4</i>	BY4741 <i>art4::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>art7</i>	BY4741 <i>art7::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hvk2</i>	BY4741 <i>hvk2::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hxt1</i>	BY4741 <i>hxt1::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hxt2</i>	BY4741 <i>hxt2::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hxt3</i>	BY4741 <i>hxt3::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hxt4</i>	BY4741 <i>hxt4::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>hxt5</i>	BY4741 <i>hxt5::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>rgt2</i>	BY4741 <i>rgt2::KanMX</i>	EUROSCARF
<i>snf1</i>	BY4741 <i>snf1::KanMX</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>HXT6-GFP</i>	BY4741 <i>HXT6-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art4</i>	BY4741 <i>art4::KanMX HXT6-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art7</i>	BY4741 <i>art7::KanMX HXT6-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art4 art7</i>	BY4741 <i>art4::KanMX art7::URA3 HXT6-GFP::HIS3</i>	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-VC:ART4-VN</i>	BY4741 <i>HXT6-VC::HIS3 ART4-VN::KanMX</i>	Este estudio
BY4741 <i>HXT1-GFP</i>	BY4741 <i>HXT1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art4</i>	BY4741 <i>art4::KanMX HXT1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art7</i>	BY4741 <i>art7::KanMX HXT1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
BY4741 <i>HXT3-GFP</i>	BY4741 <i>HXT3-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art4</i>	BY4741 <i>art4::KanMX HXT3-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art7</i>	BY4741 <i>art7::KanMX HXT3-GFP::HIS3</i>	Este estudio
BY4741 <i>SNF3-GFP</i>	BY4741 <i>SNF3-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art4</i>	BY4741 <i>art4::KanMX SNF3-GFP::HIS3</i>	Este estudio
<i>art7</i>	BY4741 <i>art7::KanMX SNF3-GFP::HIS3</i>	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-GFP [YEp]</i>	BY4741 <i>HXT6-GFP::HIS3 [pWS93]</i>	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-GFP [YEp-SNF1]</i>	BY4741 <i>HXT6-GFP::HIS3 [pWS93-SNF1]</i>	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-GFP [YEp-BMH2]</i>	BY4741 <i>HXT6-GFP::HIS3 [pACT2-BMH2]</i>	Este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741 [YEp- <i>HXT6</i>] [YEp- <i>ART4</i>] [YEp]	BY4741 [pNTrp- <i>HXT6</i>] [pCTrp- <i>ART4</i>] [pEG202]	Este estudio
BY4741 [YEp- <i>HXT6</i>] [YEp- <i>ART4</i>] [YEp- <i>SNF1</i>]	BY4741 [pNTrp- <i>HXT6</i>] [pCTrp- <i>ART4</i>] [pNLexA- <i>SNF1</i>]	Este estudio
BY4741 [YEp- <i>HXT6</i>] [YEp- <i>ART4</i>] [YEp- <i>BMH2</i>]	BY4741 [pNTrp- <i>HXT6</i>] [pCTrp- <i>ART4</i>] [pUG34- <i>BMH2</i>]	Este estudio
BY4741 [YEp] [YEp- <i>ART4</i>] [YEp]	BY4741 [pNTrp] [pCTrp- <i>ART4</i>] [pUG34]	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-VC ART4-VN</i> [YEp]	BY4741 <i>HXT6-VC::HIS3 ART4-VN::KanMX</i> [pWS93]	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-VC ART4-VN</i> [YEp- <i>SNF1</i>]	BY4741 <i>HXT6-VC::HIS3 ART4-VN::KanMX</i> [pWS93- <i>SNF1</i>]	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-VC ART4-VN</i> [YEp- <i>BMH2</i>]	BY4741 <i>HXT6-VC::HIS3 ART4-VN::KanMX</i> [pACT2- <i>BMH2</i>]	Este estudio
THY.AP4	<i>MATa ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i>	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4</i>][YEp]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4</i>] [pWS93]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4</i>][YEp- <i>SNF1</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4</i>] [pWS93- <i>SNF1</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4</i>][YEp- <i>snf1G53R</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4</i>] [pWS93- <i>snf1G53R</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4</i>][YEp- <i>snf1K84R</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4</i>] [pWS93- <i>snf1K84R</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2]	Este estudio
THY.AP4 [YEp] [YEp- <i>ART4</i>]	THY. AP4 [pBTM116] [pACT2- <i>ART4</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4S447A</i>][YEp]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4S447A</i>] [pWS93]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4S447E</i>][YEp- <i>SNF1</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4 S447E</i>] [pWS93- <i>SNF1</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>SNF1</i>] [YEp]	THY. AP4 [pNLexA- <i>SNF1</i>] [pACT2]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>SNF1</i>] [YEp- <i>ART1 / ART9</i>]	THY. AP4 [pNLexA- <i>SNF1</i>] [pACT2- <i>ART1 / ART9</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>SNF1</i>] [YEp- <i>ART4Nt</i>]	THY. AP4 [pNLexA- <i>SNF1</i>] [pACT2- <i>ART4Nt</i>]	Este estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa	Genotipo	Referencia
THY.AP4 [YEp- <i>SNF1</i>] [YEp- <i>ART4Ct</i>]	THY. AP4 [pNLexA- <i>SNF1</i>] [pACT2- <i>ART4Ct</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>SNF1-KD</i>] [YEp- <i>ART4</i>]	THY. AP4 [pNLexA- <i>SNF1-KD</i>] [pACT2- <i>ART4</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>SNF1-RD</i>] [YEp- <i>ART4</i>]	THY. AP4 [pNLexA- <i>SNF1-RD</i>] [pACT2- <i>ART4</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART1 / ART9</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART1 / ART9</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4Nt</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [pACT2- <i>ART4Nt</i>]	Este estudio
THY.AP4 [YEp- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4Ct</i>]	THY. AP4 [pBTM116- <i>BMH2</i>] [YEp- <i>ART4Ct</i>]	Este estudio
CRY1	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	DualSystems Biotech
CRY1 [YEp- <i>HXT6</i>] [YEp- <i>ART4</i>]	CRY1 [pNTrp- <i>HXT6</i>] [pCTrp- <i>ART4</i>]	Este estudio
CRY1 [YEp- <i>ART4</i>] [YEp- <i>HXT6</i>]	CRY1 [pNTrp- <i>ART4</i>] [pCTrp- <i>HXT6</i>]	Este estudio
CRY1 [YEp- <i>p53</i>] [YEp- <i>MDM2</i>]	CRY1 [pNTrp- <i>p53</i>] [pCTrp- <i>MDM2</i>]	Este estudio
CRY1 [YEp] [YEp]	CRY1 [pNTrp] [pCTrp]	Este estudio
BY4741 <i>art4::KanMX</i> <i>HXT6-GFP::HIS3</i> [YEp]	BY4741 <i>art4::KanMX HXT6-GFP::HIS3</i> [pWS93]	Este estudio
BY4741 <i>art4::KanMX</i> <i>HXT6-GFP::HIS3</i> [Yep- <i>SNF1</i>]	BY4741 <i>HXT6-VC::HIS3</i> <i>ART4-VN::KanMX</i> [pWS93- <i>SNF1</i>]	Este estudio
BY4741 <i>HXT6-VC:ART4-VN</i> [YEp- <i>BMH2</i>]	BY4741 <i>HXT6-VC::HIS3</i> <i>ART4-VN::KanMX</i> [pACT2- <i>BMH2</i>]	Este estudio

2. Técnicas de transferencia génica.

2.1. Transformación simple en levadura.

Para las transformaciones de levadura se utilizó una variación del protocolo estándar de transformación con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995). Las células de levadura (crecidas en medio YPD sólido un máximo de 36 horas) se mezclaron con entre 0,1 y 10 μg del DNA foráneo a introducir. A continuación se añadieron 5 μL de una solución de DNA monocatenario de esperma de salmón (0,1%) y 500 μL 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 12 minutos y se recogieron las células por centrifugación (1 minuto a 13000 rpm). Finalmente las células se resuspendieron en 200 μL de agua estéril y se extendieron en placas de medio selectivo.

2.2. Transformación de alta eficiencia.

En este caso la transformación de levadura se llevó a cabo por el protocolo de acetato de litio (Ito *et al.*, 1983). La cepa de levadura diana de transformación se creció en YDP o en SD con los requerimientos adecuados hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ entre 0.4 - 0.6. Tras centrifugar 5 minutos a 4000 rpm, las células se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial del cultivo con tampón TE-LiAc (acetato de litio 0.1 M pH 7.5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Después de centrifugar a 4000 rpm, las células se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial del cultivo con tampón TE-LiAc. A 50 μL de células en tampón TE-LiAc, se le añadió 2 μL de 1% DNA de esperma de salmón (Sigma), 3 μL de cada plásmido o fragmento de PCR a transformar y 300 μL de PEG TE-LiAc [tampón TE-LiAc al que se le añadió PEG al 40% (p/v)]. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, se efectuó un choque térmico de 20 minutos a 42°C y se centrifugaron y resuspendieron las células en agua estéril antes de sembrarlas en medio selectivo. Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C.

2.3. Transformaciones en bacteria.

Para las transformaciones de bacterias utilizamos un protocolo estándar de transformación por choque térmico (Hanahan, 1986). Después de añadir entre 0,1 y 1 ng de plásmido a 100 μL de bacterias competentes, se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo, se calentó a 42°C durante 1 minuto y seguidamente se volvió a poner en hielo durante 2 minutos. A continuación se añadieron 600 μL de medio LB y se incubó a 37°C entre 45 minutos y una hora. Por último se extendieron las células en placas de LB con antibiótico para la selección de las células transformadas.

3. Técnicas de manipulación genética.

3.1. Construcción de plásmidos.

La lista de plásmidos utilizada a lo largo de este trabajo se muestra en la tabla 6. La obtención de insertos de DNA se llevo a cabo mediante amplificación por PCR usando un termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf), la polimerasa *Phusion* (Thermo), y un programa adecuado a la extensión de fragmento y a los requerimientos de secuencia de los oligonucleótidos mostrados en la tabla 7. Para preparar el vector y el inserto, los fragmentos digeridos con las enzimas de restricción adecuadas se purificaron utilizando el kit *GENECLEAN TURBO* (MP Biomedicals). Para la ligación de vector e inserto se utilizó la ligasa T4 (Roche). La extracción de plásmidos se realizó mediante lisis alcalina y tratamiento con RNasa, seguida de la purificación mediante fibra de vidrio en presencia de guanidina-HCl (High Pure Plasmid Kit, Roche).

Para la construcción de *HXT6-HA* se amplificó por PCR con el oligonucleótido directo *HXT6-SfiI-Fw5'* [1] y el reverso *HXT6-SfiI-Rv3'* [2] (ver lista de oligonucleótidos en la Tabla 7) la pauta abierta de lectura del gen *HXT6* (SfiI/SfiI), y se insertó de forma direccional en el vector pNTrp (DualSystems) multicopia y con el promotor inducible por cobre *CUPI*.

De modo similar se generó la fusión *ART4-V5* con el oligonucleótido directo *ART4-SfiI-Fw5'* [3] y el reverso *ART4-SfiI-Rv3'* [4] amplificando por PCR la pauta abierta de lectura del gen *ART4* (SfiI/SfiI), e insertando de forma direccional en el vector pCTrp (DualSystems) multicopia y con el promotor inducible por cobre *CUPI*.

Para la obtención de los plásmidos que contienen mutaciones puntuales en el gen *ART4* se procedió del siguiente modo. A partir de la construcción pACT2-*ART4* y con el oligonucleótido directo *ART4-S447A-Fw5'* [5] y reverso *ART4-S447A-Rv3'* [6] se sustituyó la serina 447 de Art4 por un aminoácido de alanina, utilizando PCR de círculo rodante como sistema de amplificación. De igual forma se sustituyó el aminoácido serina 447 de Art4 por un ácido glutámico utilizando el oligonucleótido directo *ART4-S447E-Fw5'* [7] y el reverso *ART4-S447E-Rv3'* [8]. Para la eliminación del molde se utilizó la enzima de restricción DpnI.

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Marcador	Fuente
pACT2- <i>ART1 / ART9</i>	<i>LEU2</i>	TFC Beatriz Romartinez (Laboratorio Lynne Yenush)
pBTM116- <i>BMH2</i>	<i>TRP1</i>	Este estudio
pACT2- <i>ART4</i>	<i>LEU2</i>	TFC Beatriz Romartinez (Laboratorio Lynne Yenush)
pACT2- <i>ART4Nt</i>	<i>LEU2</i>	TFM Emilie Deffontaines (Laboratorio Lynne Yenush)
pACT2- <i>ART4Ct</i>	<i>LEU2</i>	TFM Emilie Deffontaines (Laboratorio Lynne Yenush)
pACT2- <i>ART4S447A</i>	<i>LEU2</i>	Este estudio

Plásmido	Marcador	Fuente
pACT2-ART4 S447E	LEU2	Este estudio
pACT2-BMH2	LEU2	Este estudio
pUG34-BMH2	HIS3	Zahrádka <i>et al.</i> , 2012
pUG34	HIS3	Zahrádka <i>et al.</i> , 2012
pNLexA-SNF1	HIS3	Tomás-Cobos y Sanz, 2002
pWS93-SNF1	URA3	Tomás-Cobos y Sanz, 2002
pLexA-snf1G53R	URA3	Mayordomo <i>et al.</i> , 2003
pLexA-snf1K84R	URA3	Mayordomo <i>et al.</i> , 2003
pWS93	URA3	Tomás-Cobos y Sanz, 2002
pNLexA-SNF1-KD	HIS3	Tomás-Cobos y Sanz, 2002
pNLexA-SNF1-RD	HIS3	Tomás-Cobos y Sanz, 2002
pNTrp-HXT6	LEU2	Este estudio
pCTrp-ART4	URA3	Este estudio
pNTrp-ART4	LEU2	Este estudio
pCTrp-HXT6	URA3	Este estudio
pNTrp-p53	LEU2	DualSystems
pCTrp-MDM2	URA3	DualSystems
pNTrp	LEU2	DualSystems
pCTrp	URA3	DualSystems
pFA6a-VN-His3MX6		Sung y Huh, 2007
pFA6a-VC-His3MX6		Sung y Huh, 2007
pFA6a-VN-kanMX6		Sung y Huh, 2007
pFA6a-VC-kanMX6		Sung y Huh, 2007
pFA6a-GFP(S65T)-HISMx6		Longtine <i>et al.</i> , 1998
pUG72		Geldener <i>et al.</i> , 2002

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia 5'-3'
1. <i>HXT6</i> -Sfil-Fw5'	5'-TATATAGGCCATTACGGCCTCACAAAGACGCTGCTATTGCA-3'
2. <i>HXT6</i> -Sfil-Rv3'	5'-ATATATGGCCGAGGCGGCCGCTTTGGTGCTGAACATTCTCTTG-3'
3. <i>ART4</i> -Sfil-Fw5'	5'-TATATAGGCCATTACGGCCTTTTCATCATCATCTCGACCT-3'
4. <i>ART4</i> -Sfil-Rv3'	5'-ATATATGGCCGAGGCGGCCGCTGAGCGATCCCGTTTTGTG-3'
5. <i>ART4</i> -S447A-Fw5'	5'-GTGATTTTTCAAAGATCTGCGGCCGCGTTACAATTGTCTTCAATG-3'
6. <i>ART4</i> -S447A-Rv3'	5'-CATTGAAGACAATTGTAACGCGGCCGAGATCTTTGAAAAATCAC-3'
7. <i>ART4</i> -S447E-Fw5'	5'-GTGATTTTTCAAAGATCTGCTGAAGCTTTACAATTGTCTTCAATG-3'
8. <i>ART4</i> -S447E-Rv3'	5'-CATTGAAGACAATTGTAAAGCTTCAGCAGATCTTTGAAAAATCAC-3'
9. <i>GFP</i> -Fw5'	5'-ATAAGCCTGCAGAAGCTTATGAGTAAAGGAGAAGAAGT-3'
10. <i>GFP</i> -Rv-3'	5'CATTGTGAGAGTTATAGTTGTATTCC3'
11. <i>ACT1</i> -Fw5'	5'-ATTGAACACGGTATTGTCACCAAC-3'
12. <i>ACT1</i> -Rv3'	5'-CCTTACGGACATCGACATCACAC-3'
13. <i>HXT6</i> -Fw5'-F2	5'-GCTCACGATGATAAGCCATTGTACAAGAGAATGTTCAAGCACCAGGTCGACGGATCCCCGGGTT-3'
14. <i>HXT6</i> -Rv3'-R1	5'-GAATTAGAGTGCATTTCAAATGCACAAATTAGAGCGTGATCATGATGATGAATTCGAGCTCGTT-3'
15. <i>HXT6</i> -Cterm-Fw5'	5'-CAATCTAGAAGAGGTGCCA-3'
16. <i>ART4</i> -Fw5'-F2	5-TCATTTGCTAATTTAATGGAGATGTTCAAAAACGGGATCGCTCAGGTCGACGGATCCCCGGGTT-3'
17. <i>ART4</i> -Rv3'-R1	5'-GTGTATGAAGTATTGCTCATATCTTTTGTGCGAAATTCGAAGACTCGATGAATTCGAGCTCGTT-3'
18. <i>ART4</i> -Cterm-Fw5'	5'-CGAAGGTCACGCTCATCG-3'
19. <i>HXT1</i> -Fw5'-F2	5'-ATGCATGATGACCAACCATTTTACAAGAGTTTGTGTTAGCAGGAAAGGTCGACGGATCCCCGGGTT-3'
20. <i>HXT1</i> -Rv3'-R1	5'-AAATTTACTGAGAAATTAATACTGTATAAGTCATTAATAATGCTCGATGAATTCGAGCTCGTT-3'
21. <i>HXT1</i> -Cterm-Fw5'	5'-TTCTGGGTTCCAGTATCC-3'
22. <i>HXT3</i> -Fw5'-F2	5'-ATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTCCGCAAGAAAGTCGACGGATCCCCGGGTT-3'
23. <i>HXT3</i> -Rv3'-R1	5'-TCATTATTGACTAGCACATCGAATCTTAAAATACACTATTATTCATCGATGAATTCGAGCTCGTT-3'
24. <i>HXT3</i> -Cterm-Fw5'	5'-CCATGGAAGTCTGCTTCATG-3'

Nombre	Secuencia 5'-3'
25. SNF3-Fw5'-F2	5'-GAAAACGCCACTAATCAACCTGTAAATGAAAATAATGATTTGAAA GGTCGACGGATCCCCGGGT-3'
26. SNF3-Rv3'-R1	5'-TCTTTCACATGATTAATAAATTATAAAGCACGTCCGCTTAATTAATATCGATGAA TTCGAGCTCGTT-3'
27. SNF3-Cterm-Fw5'	5'-CACTTCTCTCTCCGTGATG-3'
28. <i>KanMX</i> -Rv3'	5'-TAGAAAACTCATCG-3'
29. <i>HIS</i> -Rv3'	5'-GATGGCAACGCTGATTTTCG-3'
30. <i>ART4</i> -LoxP-Fw5'	5'-GGGTCCCCTATTCAAATATAGACGTCAAAAAGATGCAGATCTAAAC AGCTGAAGCTTCGTACGC-3'
31. <i>ART4</i> -LoxP-Rv3'	5'-ATTATGAGGTAGTATTATAACATTATATTATCATTTTTCAAGTGGGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG-3'
32. <i>art4Δ</i> -test-Fw5'	5'-GGGCTCTTGCAATTTTCAG-3'
33. <i>art4Δ</i> -test-Rv3'	5'-AGAATCTGACAACCTCAGTG-3'
34. <i>ART7</i> -LoxP-Fw5'	5'-GTGATGCGGTATATTCTTATACGGCTAATAGATGAATCAGGGTGCA GCTGAAGCTTCGTACGC-3'
35. <i>ART7</i> -LoxP-Rv3'	5'-TTTCAACAATGCAGTGGATTTTTTTGAACTTATACTGCCGCACGCGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG-3'
36. <i>art7Δ</i> -test-Fw5'	5'-CGAATTTGGATCAGTTGGTAT-3'
37. <i>art7Δ</i> -test-Rv3'	5'-CAAACCTGAAAACCAATAGCAG-3'

3.2 Disrupción Génica.

La disrupción de los genes *ART4* y *ART7* en la cepa BY4741 se llevo a cabo utilizando un módulo flanqueado por sitios loxP en el que el gen *URA3* de *Kluyveromyces lactis* se utiliza como marcador heterólogo. Para la amplificación por PCR de este módulo se usó el plásmido pUG72 y oligonucleótidos que contenían 20 nucleótidos específicos para la amplificación del gen marcador fusionados a 45 nucleótidos que corresponden a la secuencia inmediatamente aguas arriba del codón de inicio e inmediatamente aguas abajo del codón de parada del gen de interés (Gueldener *et al.*, 2002), generando de este modo sitios de recombinación homóloga y haciendo posible la disrupción completa de las pautas abiertas de lectura. Para *ART4* se utilizó el oligonucleótido directo *ART4*-LoxP-Fw5' [30] y el reverso *ART4*-LoxP-Rv3' [31]. En el caso de *ART7*, el oligonucleótido directo utilizado fue *ART7*-LoxP-Fw5' [34] y el reverso *ART7*-LoxP-Rv3' [35]. Los mutantes fueron confirmados mediante PCR de DNA genómico usando los oligonucleótidos específicos para *ART4*, *art4Δ*-test-Fw5' [32] y *art4Δ*-test-Rv3' [33]. En el caso de *ART7*, los oligonucleótidos de comprobación fueron *art7Δ*-test-Fw5' [36] y *art7Δ*-test-Rv3' [37]. Los mutantes fueron comprobados por PCR a partir de DNA genómico utilizando los oligonucleótidos.

3.3 Marcaje de transportadores de membrana con GFP.

Para el marcaje de genes en su extremo C-terminal con la pauta abierta de lectura de la proteína verde fluorescente (*GFP*), se amplificó por PCR el módulo de *GFP-HIS3* contenido en el plásmido pFA6a-*GFP(S65T)-HIS3MX6* (Wach *et al.*, 1997; Longtine *et al.*, 1998). Se utilizaron oligonucleótidos que contenían 20 nucleótidos específicos para la amplificación del módulo fusionados a 45 nucleótidos inmediatamente aguas arriba del codón de stop e inmediatamente aguas abajo del mismo, generando sitios de recombinación homóloga que situarían la fusión a GFP en el extremo C-terminal de los genes diana de esta técnica. Para la transformación de las células con este módulo se utilizó el método de transformación de alta eficiencia. Los genes marcados con GFP a lo largo de este estudio y los oligonucleótidos utilizados con este fin se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para el marcaje de transportadores con GFP en el extremo C-terminal y sus respectivos pares de oligonucleótidos para la comprobación de su correcta inserción.

Gen	Oligos marcaje GFP	Oligos comprobación
HXT1	<i>HXT1</i> -Fw5'-F2 [19] <i>HXT1</i> -Rv3'-R1 [20]	<i>HXT1</i> -Cterm-Fw5' [21] <i>HIS</i> -Rv3' [29]
HXT3	<i>HXT3</i> -Fw5'-F2 [22] <i>HXT3</i> -Rv3'-R1 [23]	<i>HXT3</i> -Cterm-Fw5' [24] <i>HIS</i> -Rv3' [29]
HXT6	<i>HXT6</i> -Fw5'-F2 [13] <i>HXT6</i> -Rv3'-R1 [14]	<i>HXT6</i> -Cterm-Fw5' [15] <i>HIS</i> -Rv3' [29]
SNF3	<i>SNF3</i> -Fw5'-F2 [25] <i>SNF3</i> -Rv3'-R1 [26]	<i>SNF3</i> -Cterm-Fw5' [27] <i>HIS</i> -Rv3' [29]

4. Análisis de proteínas.

4.1. Obtención de extractos proteicos de célula completa (extractos crudos).

Para la obtención de extractos proteicos, las células se crecieron hasta fase logarítmica y se recogieron 1,5 mL de cultivo por centrifugación (13000 rpm durante 5 minutos). A continuación se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50 μ L de tampón de carga Laemmli 2,5X (SDS 3,8%, dithioeritritol 0,05 M, EDTA 5 mM, sacarosa 15%, azul de bromofenol 0,125 mg/mL, Tris-HCl 0,15 M (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 (Tris-HCl 50 mM pH 7.6 , KCl 0,1 M, EDTA 5 mM, DTE 5 mM, sacarosa 20%, 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.

4.3. Electroforesis de proteínas.

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:bisacrilamida al 6%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0,1%) y una zona inferior de separación (acrilamida:bisacrilamida al 8%, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0,1%). La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a 80 V mientras que para la segunda parte (resolución) se utilizó 120 V. El tampón de electroforesis utilizado fue SDS-PAGE 1X (glicina 0,19 M, SDS 0,1% pH 8.3 ajustado con Tris).

4.4. Transferencia a membrana (*Western blot*)

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Healthcare). Para la transferencia se utilizó el set Mini-Trans Blot (BioRad) y el tampón de transferencia TOWBIN (Glicina 0,19 M, SDS 0,01%, metanol 20% pH 8.3 ajustado con Tris). La transferencia se realizó a 120 V durante 1,5 horas a 4°C.

4.5 Tinción de membranas con *Direct Blue*.

Terminada la transferencia, se tiñó la membrana con la disolución colorante *Direct Blue* (Aldrich Chemistry) para comprobar la eficiencia de la transferencia proteica y obtener un control interno de carga. Para ello, se sumergieron las membranas en la solución colorante (*Direct Blue* 71 0,008% [w/v], etanol absoluto 40% y ácido acético 10%) durante 2 minutos en agitación. Posteriormente, se eliminó el exceso de colorante por medio de la solución de lavado de *Direct Blue* (mezcla de etanol absoluto 40% y ácido acético glacial 10% en agua destilada). Para la eliminación total de la tinción se utilizó la solución de desteñido de *Direct Blue*, que contiene una mezcla de etanol absoluto 50% y bicarbonato sódico 1 M (NaHCO₃) en agua destilada.

4.6 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.

En primer lugar se bloquearon todos los sitios de unión no específicos utilizando una solución de bloqueo (Tween 20 0,1 %, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, leche desnatada 2%) 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 9), y se dejó incubando durante 16 horas a 4°C en agitación. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 (Tween 20 0,1%, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6).

Después de los lavados se añadió el anticuerpo secundario a una dilución adecuada (Tabla 9) en TBS-Tween 20 y se dejó incubando como mínimo 1 hora en agitación. Después se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

La detección se realizó utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL Prime 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, estas se incubaron previamente durante 30 minutos a 50°C en un tampón que contenía β -mercaptoetanol 100

mM, SDS 2% y Tris-HCl 62,5 mM pH 6.7, y después de 3 lavados, se reincubaron con otro anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

Tabla 9. 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 así como el proveedor.

Anticuerpo Primario	Dilución	Proveedor	Anticuerpo Secundario	Dilución	Proveedor
α -GFP	1:10000	Roche	α -mouse-HRP	1:5000	Amersham
α -HA	1:5000	Covance	α -mouse-HRP	1:5000	Amersham
α -V5	1:5000	Roche	α -mouse-HRP	1:5000	Amersham
α -LexA	1:20000	Abcam	α -Rabbit-HRP	1:5000	Amersham

5. Co-inmunoprecipitación.

Para el ensayo de co-inmunoprecipitación, las células transformadas con las diferentes combinaciones de plásmidos fueron crecidas en 100 mL de medio mínimo con rafinosa como fuente de carbono y en presencia de CuSO_4 100 μM hasta que alcanzaron una DO de entre 0.5 - 0.7. A continuación los 100 mL de cultivo se recogieron por centrifugación en 2 alícuotas de 50 mL y las células se resuspendieron en 5 mL de PBS al que se le añadió agua MiliQ o glucosa 2% dependiendo de la muestra. Después de incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante, se añadió el *crosslinker* DSP a una concentración final 2.5 mM y se dejó incubar otros 15 minutos en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se añadió Tris pH 8 a una concentración final de 20 mM para parar la reacción y se dejó 15 minutos más en agitación. Seguidamente se recogieron las células por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm. Para la extracción de proteínas, las células sometidas a tratamiento se lavaron una vez con agua MiliQ, se resuspendieron en 500 μL de tampón RIPA [Tris 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.1%, ácido deoxicólico 1%, 1 tableta de inhibidor de proteasas (Roche)] y se vortearon en 3 tandas de 1 minuto junto con 500 μL de bolas de vidrio (0.5 mm, BioSpec). A continuación los extractos se centrifugaron 5 minutos a 4°C a máxima velocidad y 300 μL del sobrenadante fueron transferidos a un tubo nuevo donde se le añadió 1 μg del anticuerpo anti-HA *High-Affinity* (Roche). El conjunto se incubó entre 2 y 4 horas en un balancín a 4°C. Transcurrido el tiempo, se transfirió la solución a un tubo en el que previamente se habían lavado 3 veces con tampón RIPA 30 μL de Protein G agarosa (Roche). La mezcla se incubó durante toda la noche en un balancín a 4°C. En el siguiente paso, se dejó precipitar la resina sin centrifugación y se realizaron 4 lavados de la misma con tampón RIPA. Finalmente, la resina se resuspendió en 50 μL de tampón Laemmli 2,5X suplementado con DTT 50 mM y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Las muestras se analizaron por *Western blot*.

6. Doble híbrido en levadura

La técnica de doble híbrido fue diseñada como herramienta genética para la identificación *in vivo* de interacciones entre proteínas (Fields and Song, 1989). Esta técnica permite la caracterización de interacciones ya establecidas y también la identificación de nuevas interacciones proteína-proteína. En este ensayo genético, la interacción de dos proteínas se mide a través de la reconstitución de un factor de transcripción funcional en levadura.

Dos quimeras, una que contiene un dominio de unión a DNA (la proteína LexA de *E.coli* en el plásmido pBTM116) fusionado a la proteína X y otra que contiene un dominio de activación (Gal4 de levadura en el plásmido pACTII) fusionado a la proteína Y, son co-transformadas en cepas de levadura adecuadas para dicha técnica. Si las proteínas objeto de estudio interaccionan, se reconstituirá el factor de transcripción que activará la transcripción de genes reporteros (*HIS3*, *ADE2*, *LacZ* en nuestro caso).

7. Ensayo β -galactosidasa (ensayo cuantitativo en líquido).

Este ensayo de medida de la actividad β -galactosidasa se utilizó para la cuantificación de la interacción proteína-proteína (Ludin *et al.*, 1998). Para ello, se recogió por centrifugación 1 mL de cultivo celular en fase logarítmica. Las células fueron resuspendidas en 100 μ L de GTED (glicerol 20%, Tris 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8, DTE 1 mM) y permeabilizadas con 6 μ L de TET (1 volumen de tolueno, 1 volumen de Triton X-100 10%, 4 volúmenes de etanol). 10 μ L de células permeabilizadas se mezclaron con 190 μ L de tampón Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM y β -mercaptoetanol 50 mM). Como sustrato se utilizaron 40 μ L de ONPG (o-Nitrofenil β -D-Galactopiranosido, Sigma) 4 mg/mL y la reacción se detuvo con 100 μ L de Na_2CO_3 1 M. La coloración amarilla desarrollada a 28°C como resultado de la hidrólisis del ONPG en D-galactosa y o-Nitrofenol (ONP, que absorbe luz en solución alcalina) y que cataliza la enzima β -galactosidasa, se midió a una DO_{415} y se expresó en unidades Miller.

$$\text{Unidades Miller} = (680 \times \text{DO}_{600}) / (t \times V_c \times \text{DO}_{415})$$

t= tiempo del ensayo en minutos

V_c = volumen del cultivo

Las unidades Miller se definen como la cantidad de β -galactosidasa capaz de hidrolizar un nmol de ONPG por minuto a 28°C y pH 7.

8. Análisis Northern blot.

Se realizaron extracciones de RNA a partir de 50 mL de cultivo celular crecido hasta fase logarítmica en medio selectivo. Después de alcanzar una DO de entre 0.4-0.6 ($z7 \cdot 10^6$ células/mL), las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con agua y resuspendidas en 150 μ L de TCES (Tris 0,2 M, NaCl 0,2 M, EDTA 50 mM, SDS 2%, pH 8). Para la extracción de mRNA, se añadió un volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1, PCI) y las células se lisaron con la ayuda de un vórtex y 500 μ L de bolas de vidrio. Después de añadir 200 μ L de TCES y una breve centrifugación, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió un volumen de PCI. Tras homogenizar con un vórtex, la mezcla se centrifugó durante 3 minutos. El mRNA contenido en la fase superior se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol y se resuspendió en 50 μ L de agua MiliQ. Para la cuantificación de la cantidad de mRNA obtenido se utilizó un Nanodrop ND-1000.

Aproximadamente 20 μ g de mRNA resuspendidos en 16 μ L de tampón de carga 1.25X fueron separados en un gel de agarosa 1% que contenía un 2.2% de formaldehído y transferidos sobre una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham). El RNA se fijó a la membrana de nylon utilizando un *UV Stratalinker* (Stratagene). A continuación la membrana se incubó con las sondas marcadas radioactivamente (300-900 pb) en tampón PSE (NaPO₃ 300 mM pH 7.2, SDS 7%, EDTA 1 mM) durante toda la noche. La sonda GFP (utilizada para la detección del mRNA de *HXT6*) se obtuvo mediante amplificación por PCR del módulo GFP contenido en el plásmido pFA6a-GFP(S65T)-HISMX6 con los oligonucleótidos directo *GFP-Fw5'* [9] y reverso *GFP-Rv-3'* [10]. La sonda de actina, generada por PCR a partir del gen *ACT1* y los oligonucleótidos *ACT1-Fw5'* [11] y *ACT1-Rv3'* [12], se utilizó como control interno de carga. Las sondas se marcaron radioactivamente utilizando High Prime (Roche) y [α^{32} P] dCTP. Para ello, 25 ng de fragmento de PCR en un volumen final de 13,5 μ L se incubaron a 95°C durante 10 minutos para ser transferidos posteriormente a hielo. Seguidamente se le añadieron 4 μ L de High Prime y 2,5 μ L de [α^{32} P] dCTP. La reacción se incubó 10 minutos a 37°C y se detuvo con EDTA 0.2 M pH 8 e una incubación a 65°C durante 10 minutos. Previo a su uso, la sonda se desnaturalizó a 95°C.

Después de la hibridación, las membranas fueron lavadas dos veces con tampón de lavado SSC 4X - 0.1% SDS y una última vez en SSC 0.4X - 0.1% SDS. Una vez limpias y selladas, se procedió a la exposición en un *Hypercassete* (Amersham) con pantalla intensificadora. La exposición se llevó a cabo 5 horas a -80°C. La señal de radiactividad se detectó mediante películas Fuji RX. La cuantificación de la señal se llevó a cabo exponiendo los filtros de una pantalla *Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager* a temperatura ambiente. La imagen obtenida se cuantificó mediante un lector *Fujifilm FLA5100TM* utilizando el programa Fujifilm Image Reader y se procedió a la cuantificación mediante el software Image Gauge v. 4.0 de Fujifilm.

Para la reutilización de la membrana en una segunda hibridación, la membrana aún húmeda se incubó en una solución SDS 0.1% a 100°C para la eliminación de la sonda previamente hibridada. Tras ser enfriada a temperatura ambiente, se incubó nuevamente con la nueva sonda siguiendo el mismo procedimiento expuesto anteriormente.

9. BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*).

Para generar las cepas adecuadas para este ensayo se amplificaron por PCR los fragmentos N-terminal y C-terminal de la proteína fluorescente Venus, fusionados a secuencias de recombinación homóloga para marcar en C-terminal los genes diana de estudio, *HXT6* y *ART4*. Para el marcaje de *HXT6*, se utilizó el oligonucleótido directo *HXT6*-Fw5'-F2 [13] y el reverso *HXT6*-Rv3'-R1 [14] para amplificar el módulo VC:*HIS3* contenido en el plásmido pFA6a-VC155-*HIS3*MX6. Del mismo modo se amplificó el módulo VN:*kanMX* contenido en el plásmido pFA6a-VN173-*kanMX*6, con el oligonucleótido directo *ART4*-Fw5'-F2 [16] y el reverso *ART4*-Rv3'-R1 [17] que contienen secuencias de recombinación homóloga para el marcaje de *ART4* en C-terminal. Estos productos de PCR se transformaron en la cepa BY4741 por el método de alta eficiencia y posteriormente se seleccionaron por PCR aquellas colonias con los genes *HXT6* y *ART4* marcados con las dos mitades de Venus. Los oligonucleótidos utilizados para la comprobación de la correcta inserción de la dos mitades de la proteína fluorescente en el extremo C-terminal fueron *HXT6*-Cterm-Fw5' [15] y *HIS*-Rv3' [29] en el caso de *HXT6*, y *ART4*-Cterm-Fw5' [18] y *KanMX*-Rv3' [28] en el caso de *ART4*. Las colonias positivas se crecieron en medio mínimo líquido con rafinosa 2% como fuente de carbono hasta una DO_{600} 0.5 - 0.7 y después de aplicar el tratamiento adecuado se analizaron por microscopía confocal con el microscopio modelo Zeiss 780 Objetivo Plan-Apo 63X/1.4OilDIC a una longitud de onda de excitación de 514 nm y una emisión entre 560-570 nm.

Para la cuantificación de la localización subcelular de la señal generada por la proteína fluorescente Venus, se utilizó el programa de análisis de imágenes Fiji (ImageJ). En primer lugar se seleccionó un área de la imagen correspondiente a la superficie de una célula, intentando ajustar al máximo el área seleccionada al contorno externo de la célula. A continuación se aplicó la 'Macro' compuesta de los comandos "Measure", "Enlarge= -5 pixel", "Measure". De esta manera se tomó la medida de la señal de toda la célula y de la señal presente en la célula a excepción de la membrana. Los parámetros que se utilizaron para la toma de medidas fueron "Area" e "Integrated Density" y fue este último parámetro el utilizado para el análisis de los datos. De cada una de las condiciones descritas, 30 células fueron analizadas individualmente. Los datos se presentan en forma de porcentaje de señal presente en la membrana plasmática.

10. Cuantificación de la señal de GFP.

Para los ensayos de cuantificación de GFP se utilizó la función de fluorímetro del GloMax-Multi Detection System (Promega) con el filtro azul (Blue optical kit) con una longitud de onda de excitación de 490 nm y emisión entre 510-570 nm. Para ello, las cepas objeto de estudio se crecieron en medio líquido hasta la DO_{600} indicada en cada experimento y se centrifugaron a máxima velocidad 1.5 mL de cultivo. Después de lavar una vez las células, se resuspendieron en 200 μ L de agua MiliQ y se procedió a la toma de medidas.



Resultados

Capítulo 1



Regulación postraduccionnal de transportadores de iones

1. Estudio de la regulación del transportador de potasio Trk1

La homeostasis de iones es un proceso esencial para cualquier célula viva. Debido a su importante implicación en diversas actividades celulares, las concentraciones de H^+ , K^+ y Na^+ deben de estar fuertemente reguladas. Como reflejo de ello, problemas a nivel celular relacionados con la homeostasis iónica están relacionados con enfermedades humanas tales como la epilepsia (David *et al.*, 2009) o el Alzheimer (Etcheberrigaray *et al.*, 1993, Vitvitsky *et al.*, 2012) y en plantas con la tolerancia a entornos con altas o bajas concentraciones de sales (revisado en Shabala y Cuin, 2008).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un excelente modelo para el estudio de la homeostasis de cationes, entre los que se encuentra el potasio (revisado en Ariño *et al.*, 2010, Cyert y Philpott, 2013, Ariño *et al.*, 2014) cuya concentración en este organismo oscila entre 200 - 300 mM. El

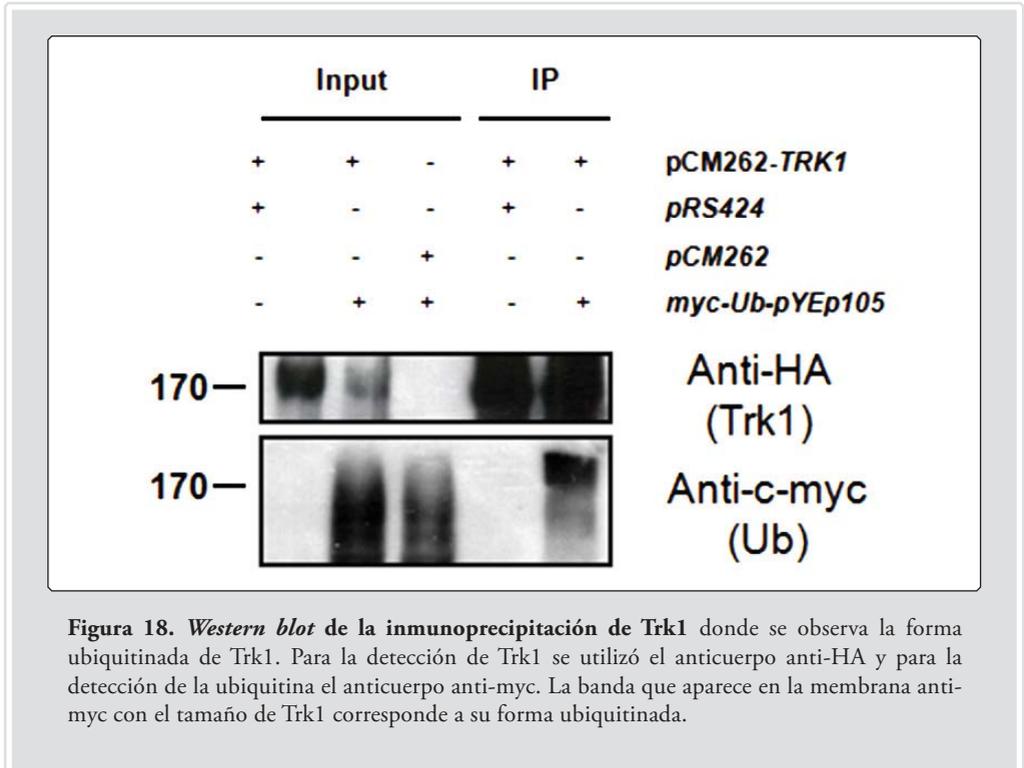
mantenimiento de estas concentraciones viene facilitada fundamentalmente por el potencial de membrana generado por la H⁺-ATPasa, Pma1 (Serrano et al., 1986), por los sistemas de toma de potasio de alta afinidad Trk1 y Trk2 (Gaber *et al.*, 1988) y por los transportadores Nha1 y Tok1, encargados de su extrusión (Bañuelos *et al.*, 1998, Bertl *et al.*, 2003). La actividad de estos transportadores está regulada, como se mencionó con anterioridad, principalmente a nivel postraduccional, con la implicación de fosfatasa, quinasas y procesos de recambio de proteínas. Ejemplo de ello son los transportadores de potasio Trk1/2, cuya estabilidad se ve alterada por diferentes quinasas y fosfatasa. Las quinasas funcionalmente redundantes Hal4 y Hal5 son necesarias para estabilizar Trk1 en la membrana plasmática, especialmente en condiciones de baja concentración extracelular de potasio (Perez-Valle *et al.*, 2007), del mismo modo que la quinasa Sky1 estaría implicada en la regulación de Trk1/2 y de otros componentes implicados en la homeostasis de potasio (Erez y Kahana 2002; Forment *et al.*, 2002). La fosfatasa Ppz1 interacciona físicamente con Trk1, y un aumento de los niveles de fosforilación en el mutante *ppz1 ppz2* sugiere que Trk1 también es sustrato de estas fosfatasa. Hal3 regula negativamente a Ppz1 y la asociación de estas dos proteínas es dependiente de pH, dando lugar a una respuesta en la que la interacción Hal3-Ppz1 permite que los niveles intracelulares de H⁺ y K⁺ sean ajustados en coordinación a través de la regulación de Trk1 (Yenush *et al.*, 2002, 2005).

Menos conocida es la regulación de Trk1 a través de la vía endocítica, ruta que más que modular su actividad, regula su presencia en la membrana plasmática. No existen evidencias anteriores que impliquen a la maquinaria de endocitosis en la regulación de Trk1, que siguiendo un patrón general, implicaría al polipéptido ubiquitina. Por ello, una pieza de nuestros estudios fue dirigida al estudio de esta parte de la regulación postraduccional de Trk1. Para ello, se planteó que si Trk1 se encontraba regulado mediante endocitosis, un aspecto fundamental en esta ruta de señalización es la ubiquitinación del transportador y por ello la detección de la forma ubiquitinada de Trk1 podría ser un buen punto de partida para posteriores estudios. Dentro de la misma línea, se planteó el realizar un rastreo de una genoteca de levadura en un ensayo de doble híbrido utilizando como cebo parte de Trk1, concretamente 70 aminoácidos correspondientes al extremo carboxi-terminal de la proteína que pertenecen a un dominio citoplasmático, con la finalidad de encontrar posibles proteínas que interaccionen con esa parte del transportador, pudiendo tratarse bien de quinasas o fosfatasa adicionales a las ya conocidas o bien proteínas implicada en otros niveles de regulación como las proteínas de la familia ART o las E3 ubiquitina ligasa. Se eligió esta parte del transportador en base a datos previos que demostraron que la delección de los últimos 35 aminoácidos de Trk1 genera una forma muy estable de Trk1 que no se acumula en la vacuola en mutantes *hal4 hal5*, como sucede con la versión silvestre (Pérez-Valle, 2007).

1.1. Ubiquitinación de Trk1

Para intentar detectar la forma ubiquitinada de Trk1, se co-transformaron los vectores pCM262-*TRK1* (epítipo HA, promotor regulable por doxiciclina) y el pYEp105-*UB* (epítipo myc, promotor inducible por cobre), que contenían la pautas abiertas de lectura de las proteínas Trk1

y ubiquitina respectivamente, en la cepa W3031-A *trk1 trk2*. Las cepas positivas para la co-transformación, portadoras de diferentes combinaciones de vectores y vectores vacíos utilizados como controles, se crecieron en medio líquido SD -W-U carente de doxiciclina (sobreexpresión de Trk1) y con una concentración final de CuSO_4 de 100 μM (sobreexpresión de ubiquitina). Un cultivo de 150 mL se creció a 30°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} \approx 0.6$ y las células se recogieron por centrifugación y fueron procesadas para llevar a cabo la inmunoprecipitación de Trk1 utilizando el anticuerpo anti-HA (ver materiales y métodos). Posteriormente, las muestras fueron sometidas a análisis *Western blot*. El resultado se muestra a continuación.



Como se observa en la figura 18, en las muestras correspondientes a la inmunoprecipitación, aparece una banda que se corresponde con el tamaño molecular de Trk1 en *Western blot* con el anticuerpo anti-myc, empleado para la detección de la ubiquitina y que por tanto muestra la forma ubiquitinada de Trk1. Este hecho, junto con datos adicionales que sugieren que el transportador de potasio de alta afinidad es sometido a regulación endocítica, como el ejemplo del mutante *hal4 hal5* en el que Trk1 es dirigido rápidamente a la vacuola en ausencia de suplemento de potasio, o el efecto que la delección de los últimos 35 aminoácidos de Trk1 tiene un sobre la estabilidad del transportador en la membrana plasmática del mutante *hal4 hal5* bajo todas las condiciones testadas (Perez-Valle *et al.*, 2007). Estos datos apoyan la hipótesis acerca de que el transportador Trk1 está regulado por endocitosis, aunque experimentos adicionales serán necesarios para entender tanto las condiciones en las que se produce la ubiquitinación como los

aspectos bioquímicos implicados en el proceso. Cabe destacar que en este ensayo, tanto Trk1 como la ubiquitina están sobre expresados, lo que podría llegar a producir artefactos. Realizamos varios abordajes adicionales para confirmar la ubiquitinación de Trk1 con proteínas expresadas a nivel fisiológico sin éxito.

1.2. Rastreo de doble híbrido para la identificación de proteínas que interaccionen con Trk1

Un aspecto importante a la hora de estudiar la regulación de cualquier proteína es la identificación de proteínas que interactúen con la proteína de interés. Por ello decidimos diseñar un rastreo para identificar proteínas que interaccionen físicamente con Trk1. El abordaje inicial planteado fue el uso del sistema de detección de interacciones proteína-proteína Split-Trp, pero como se explica en el Anexo 1, no conseguimos disponer de bibliotecas aptas para este rastreo. Como hemos mencionado con anterioridad, el extremo carboxi-terminal citoplasmático de Trk1 parece tener un papel relevante en su posible regulación por endocitosis, puesto que su delección estabiliza a Trk1 en la membrana plasmática (Perez-Valle *et al.*, 2007). Ya que no podíamos utilizar la técnica del doble híbrido con el transportador Trk1 completo debido a que no permite el estudio de transportadores anclados a la membrana, se presentó como alternativa la posibilidad de realizar el rastreo utilizando como cebo únicamente los últimos 70 aminoácidos del extremo C-terminal de Trk1. Con esta finalidad, la secuencia de 210 nucleótidos correspondiente al extremo C-terminal de *TRK1* se clonó en el vector pBTM116, permitiendo la fusión al dominio de unión a DNA (BD, *binding domain*). El dominio BD permitiría enfrentar la proteína cebo a una genoteca de levadura contenida en el vector pACT2, originando la fusión de proteínas al dominio de activación (AD, *activation domain*), complementario al BD y que juntos reconstituyen un factor de transcripción que viajará al núcleo y activará la transcripción de genes reporteros en respuesta a la interacción física entre dos proteínas.

Para llevar a cabo el rastreo, se transformó mediante el protocolo de alta eficiencia la cepa de levadura AP4 (ver apartado de materiales y métodos) por una parte con el vector cebo, es decir, pBTM116-*TRK1*-210bp, y por otra parte con la genoteca de levadura contenida en el vector pACT2. Los transformantes se plaquearon en medio sólido SD -W-L-H cuya selección asegura el crecimiento de las células portadoras de ambos plásmidos (-W-L) y, en un principio, de aquellas células donde se produzca interacción entre la proteína cebo y alguna proteína presa (-H). Al mismo tiempo, se creció una décima parte de las células (20 μ L) de tres de las veinte transformaciones realizadas en placas de medio sólido SD -W-L, con la finalidad de calcular la eficiencia de la transformación mediante el recuento de colonias para obtener por una parte una idea aproximada del número de genes rastreados en el ensayo, y por otra, información adicional acerca de su robustez o representatividad.

El número de colonias rastreadas fue de aproximadamente 1.231.000, suficientes para considerar el ensayo como representativo si tenemos en cuenta que el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

posee 6.000 genes. Como resultado de la transformación y el crecimiento de las células en medio SD -W-L-H, se obtuvieron un total de 92 colonias que posteriormente se sometieron a diferentes análisis para descartar los falsos positivos que con frecuencia aparecen en este tipo de ensayos. Para ello, por una parte se llevaron a cabo ensayos enzimáticos en placa para confirmar la existencia de la supuesta interacción, técnica que aprovecha el hecho de que las células que presentan interacción expresan además la enzima β -galactosidasa, que cataliza la conversión de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranosido) en galactosa y 4-cloro-3-brom-indigo, que forma un precipitado de color azul intenso y cuya acumulación hace fácilmente reconocibles las colonias positivas. Por otra parte, las colonias candidatas se re-sembraron en medio sólido SD -W-L-A como vía alternativa de confirmación de la interacción ya que el gen *ADE2*, al igual que *HIS3*, también sirve como reportero de interacción en la cepa AP4.

A partir de las colonias de levadura positivas, se purificaron los plásmidos que contenían las secuencias codificantes de las proteínas presa, se transformaron en *E.coli* y tras su amplificación se sometieron a diferentes análisis de restricción, con la finalidad de detectar posibles repeticiones de los plásmidos rescatados. Los vectores purificados a partir de las cepas que habían superado todas las pruebas tanto a nivel proteico como genético se transformaron de nuevo en la cepa AP4 junto con el plásmido vacío pBTM116 o con el plásmido cebo pBTM116-*TRK1*-210pb, para confirmar la interacción y descartar falsos positivos. Tras descartar varias de las colonias supuestamente positivas mediante este método, ya que en la mayoría de los casos daban coloración azul en los ensayos β -galactosidasa incluso cuando eran enfrentadas al vector vacío, solo una de las 92 colonias analizadas supero todos los puntos de control, siendo en definitiva el único positivo real tras el rastreo.

El siguiente paso fue el de secuenciación del gen contenido en el vector pACT2 y el análisis de la secuencia. Tras realizar un “Blast” con la secuencia utilizando la plataforma de datos *Saccharomyces Genome Database*, la secuencia fue identificada como *IRC20*, en cuya anotación se le atribuía la función de helicasa putativa. Para examinar si *Irc20* estaba relacionada de algún modo con el transporte de potasio y por tanto con *Trk1*, se realizaron goteos utilizando diferentes concentraciones de cloruro de litio (LiCl) para comparar el crecimiento de la cepa mutante *irc20* con la cepa silvestre. Concretamente, las concentraciones de cloruro de litio utilizadas en placas de YPD fueron 100, 200 y 300 mM. El goteo se realizó utilizando diluciones seriadas como se describe en el apartado de materiales y métodos. Después de 5 días de incubación a 28°C, en ningún momento se observaron diferencias en el patrón de crecimiento, por lo que no se encontró relación entre *Irc20* y el transporte de potasio y se decidió dar por concluido el ensayo de doble híbrido.

2. Estudio de los niveles de activación de Pma1 en respuesta a ayuno de potasio como confirmación a la predicción de un modelo matemático

Además de las aproximaciones moleculares como las descritas anteriormente, la regulación de la homeóstasis iónica puede ser estudiada también desde otras perspectivas como es la biología de sistemas. Los modelos matemáticos que emulan las redes de relaciones entre diferentes proteínas, entre ellas transportadores de la membrana plasmática, son un ejemplo de ello, y en lo que respecta a la homeóstasis de iones una aproximación de estas características ha demostrado ser una valiosa herramienta para la mejor comprensión de los fenómenos que ocurren *in vivo*.

Concretamente, se han desarrollado modelos matemáticos para la representación de los sistemas implicados en la regulación del potasio intracelular (Trk1, Trk2, Pma1, Nha1, Tok1) y de las relaciones entre ellos frente a condiciones como el ayuno de potasio, con la finalidad de identificar los sistemas de transporte implicados en el mantenimiento de la concentración de potasio intracelular en respuesta a bajas concentraciones de potasio extracelular. Con esta finalidad se desarrollaron modelos matemáticos, que junto con un algoritmo de *reverse tracking* permitieron la identificación de mecanismos implicados en la homeostasis de potasio que posteriormente fueron comprobados y confirmados experimentalmente, siendo en esta parte donde nuestra aportación al trabajo tuvo su mayor relevancia.

El modelo matemático que se desarrolló incorporaba, de manera minimalista, los mecanismos esenciales que se conocen como importantes para la homeóstasis de potasio. Así, el modelo describe la dinámica del acoplamiento entre la concentración de potasio, el pH interno, la concentración de dióxido de carbono, el potencial de membrana y el volumen celular. Tras la aplicación del algoritmo de *reverse tracking* sobre cada uno de los sistemas implicados en la regulación de la homeóstasis de potasio, el modelo predijo que como consecuencia de un ayuno de potasio se producirían flujos de protones a través de una rápida activación de la H⁺-ATPasa, Pma1, y del desplazamiento de las reacciones hacia la producción de anión bicarbonato y protones a partir del ácido carbónico, cuya consecuencia en ambos casos sería la hiperpolarización de la membrana que intentaría ser compensada con K⁺, razón por la cual ambos mecanismos podrían ser considerados como reguladores de la homeóstasis de potasio.

Nuestra aportación al trabajo fue la de cuantificar la actividad de Pma1 en respuesta a ayuno de potasio en extractos crudos de membranas de cepas WT y *trk1 trk2* utilizando un método *in vitro* que ha sido ampliamente establecido como una medida fiel de la actividad *in vivo* de Pma1 (Serrano, 1978; Serrano, 1983; Portillo y Serrano, 1988). Los datos obtenidos confirmaron experimentalmente la predicción del modelo acerca de la activación de Pma1 en respuesta a ayuno de potasio, y el estudio en su totalidad, incluyendo los datos y materiales y métodos empleados, se muestra en la publicación adjuntada en esta tesis (Anexo 2).

Capítulo 2



Regulación de transportadores de glucosa a través de la familia de proteínas ART

1. Caracterización bioquímica de la ruta de señalización Snf1 - Art4 - 14-3-3.

1.1 Estudio de la interacción de la familia ART con la proteína quinasa Snf1.

Como ya fue descrito en trabajos anteriores (Shinoda and Kikuchi, 2007), la proteína quinasa Snf1 está implicada en la fosforilación de Art4, proteína que forma parte de la familia de proteínas relacionadas con las arrestinas (ART). Para comprobar la existencia de una interacción física entre ellas, se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido. Además de Art4, se incluyeron el resto de miembros de esta familia para determinar la especificidad de la interacción. Para ello, se clonaron en el vector pACT2 todos los componentes de este conjunto (Art1-Art9) y se enfrentaron a Snf1, cuya pauta de lectura abierta se clonó en el vector pNLexA. Mediante la utilización de estos vectores se consigue la expresión de las diferentes proteínas de interés fusionadas a un dominio de activación transcripcional (AD), en el caso de las pautas de lectura abiertas clonadas en el vector pACT2, o de proteínas fusionadas a un dominio de unión a DNA (BD) en aquellos genes clonados en el vector pNLexA. En el caso en el que exista interacción física entre las proteínas estudiadas, el dominio de activación y el dominio de unión reconstituirán un factor de transcripción que viajará al núcleo y activará la transcripción de un gen reportero, en este caso *ADE2*, confiriendo

a las células la capacidad de crecimiento en un medio carente del aminoácido adenina. Por esta razón las células transformadas con ambos vectores y con las diferentes combinaciones *SNF1-ARTs* son crecidas en medio mínimo SD carente de triptófano y leucina (selección para los vectores) y adicionalmente, en este mismo medio no suplementado con adenina (selección de la interacción). Como se muestra en la figura 19, no solo existe una interacción física entre *Snf1* y *Art4* como estudios anteriores hacían suponer, sino también entre *Snf1* y *Art7*, proteína estrechamente relacionada con *Art4* y que sugiere que ambas podrían estar sometidas a un mecanismo de regulación similar.

Las cepas utilizadas en el ensayo anterior se crecieron en medio líquido selectivo y se recogieron muestras que posteriormente fueron sometidas a análisis *Western blot* con el fin de mostrar la correcta expresión de cada una de las proteínas objeto de estudio. Como se muestra en la figura 20, los miembros de la familia ART en su totalidad se encuentran clonados correctamente en el vector pACT2,

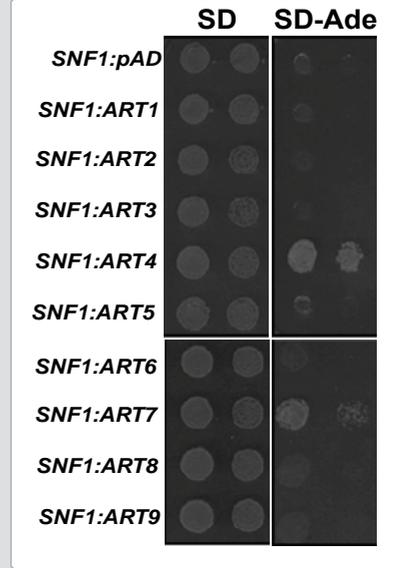


Figura 19. Las proteínas *Art4* y *Art7* interaccionan físicamente con la quinasa *Snf1*. El crecimiento en medio SD sin adenina de las cepas portadoras de los vectores pLexA-*SNF1* en combinación con los vectores pACT2-*ART4* o pACT2-*ART7* es indicativo de la existencia de interacción física entre estas proteínas.

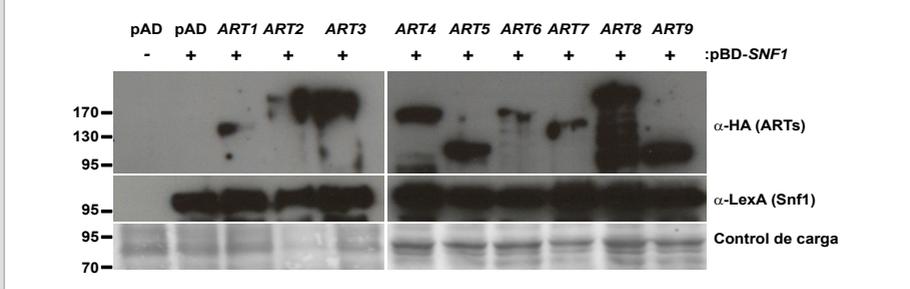


Figura 20. Análisis *Western Blot* en el que se muestra la correcta expresión de las proteínas *Art* y la quinasa *Snf1*. Mediante la expresión en el vector pACT2, aparte de obtener la fusión de la correspondiente proteína al AD, las proteínas quedan marcadas con el epítipo HA que será utilizado para su detección mediante un anticuerpo anti-HA. Del mismo modo, las proteínas expresadas con el vector pLexA quedan marcadas con el epítipo LexA que se utilizará para su detección con un anticuerpo anti-LexA. La cantidad de proteína presente en cada muestra se observa en la membrana teñida con *Direct Blue* en el panel inferior. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

observándose el peso molecular adecuado de la proteína fusionada al dominio de activación (AD). Los pesos moleculares de las proteínas nativas se muestran en la tabla 10. Del mismo modo, la banda que corresponde a la proteína quinasa Snf1 fusionada al dominio de unión (BD) aparece en cada una de las cepas estudiadas, demostrándose así su co-expresión con todos los miembros de la familia ART.

Tabla 10. Peso molecular de las proteínas de la familia ART.

Proteína	Peso molecular (KDa)
Art1	90
Art2	124
Art3	117
Art4	92
Art5	65
Art6	102
Art7	80
Art8	125
Art9	61

1.2. Mapeo de la interacción entre Art4 y Snf1.

Para determinar las regiones de ambas proteínas implicadas en la interacción, se enfrentaron en un ensayo de doble híbrido el dominio regulador (RD) y el dominio quinasa (KD) de Snf1 con la proteína Art4. Siguiendo la misma aproximación, Art4 se dividió en dos mitades a las que se denominó Art4 N-terminal (aa 1-395) y C-terminal (aa 396-837) que fueron confrontadas a la quinasa Snf1. Como se deduce de la figura 21, las partes implicadas en la interacción de ambas proteínas son el dominio regulador de Snf1 y el extremo N-terminal de Art4, que contiene el dominio arrestina característico de la familia ART.

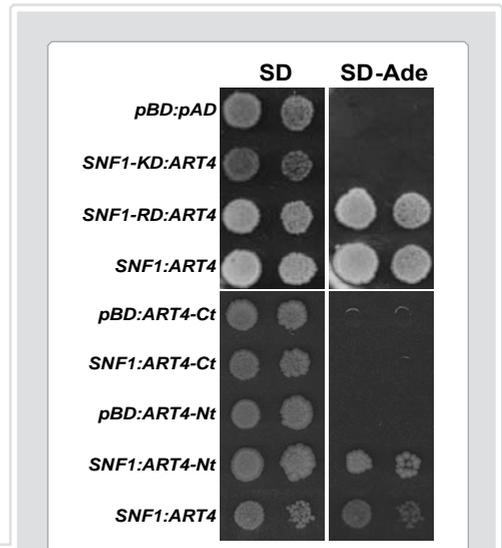


Figura 21. El dominio regulador (RD) de Snf1 y el extremo N-terminal de Art4 son los responsables de la interacción entre ambas proteínas. Del mismo modo que en experimentos anteriores, los dominios de Snf1 se fusionaron al dominio de unión a DNA (BD) mediante el vector pNLexA y los extremos N-terminal y C-terminal de Art4 se fusionaron al dominio de activación (AD) mediante la utilización del vector pACT2. Las cepas con las diferentes combinaciones de vectores se crecieron en medio líquido hasta alcanzar la saturación y posteriormente fueron sometidas a diluciones seriadas en agua y transferidas a medio sólido SD completo y medio SD sin suplemento de adenina. Las imágenes fueron tomadas después de 48 horas de crecimiento a 28°C

A continuación se procedió al análisis de las cepas utilizadas en el anterior ensayo mediante *Western blot*, con la finalidad de comprobar la correcta expresión de las proteínas implicadas o de parte de las mismas. Como se muestra en la figura 22, los patrones de bandas se ajustan a los esperados, dando mayor validez a los resultados observados.

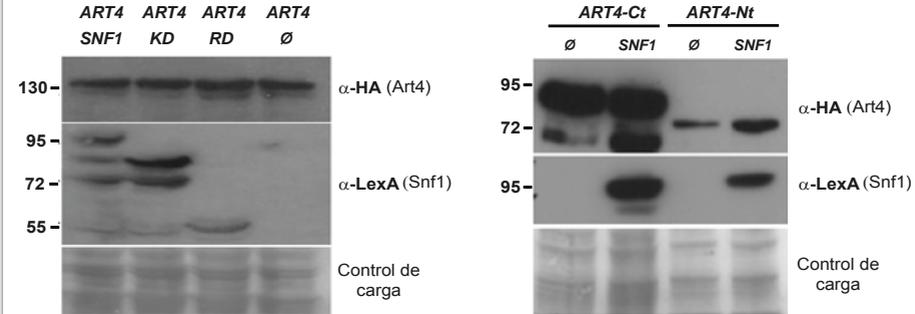


Figura 22. Análisis *Western Blot* en el que se muestra la correcta expresión de los diferentes dominios de las proteínas Snf1 y Art4. Con la expresión en el vector pACT2 y pNLexA se obtienen las fusiones a los epítomos HA y LexA respectivamente. Mediante los anticuerpos anti-HA y anti-LexA se detecta la expresión de las diferentes proteínas y sus dominios. La cantidad de proteína presente en cada muestra se observa en la membrana teñida con *Direct Blue* en el panel inferior. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de las figuras (kDa).

1.3. Estudio de la interacción de la familia ART con la proteína Bmh2 (14-3-3).

Estudios previos realizados en mamíferos demostraron la implicación de las proteínas 14-3-3 en la regulación de la proteína ortóloga de Rsp5 (Bhalla et al. 2005; Ichimura et al. 2005). Estos datos, junto con los que demuestran la interacción de las proteínas 14-3-3 de levadura (Bmh2) con proteínas adaptadoras de Rsp5 (Becuwe et al. 2012; Merhi y Andre, 2012) llevaron al planteamiento de un ensayo de doble híbrido entre la proteína Bmh2 y los 9 miembros de la familia ART. En esta ocasión el gen *BMH2* se clonó en el vector pBTM116 que permite la fusión de la proteína Bmh2 al dominio de unión a DNA (BD) y se enfrentó a los nueve miembros de la familia ART cuyas pautas de lectura abierta habían sido clonadas previamente en el vector pACT2 (AD). Las cepas transformadas con las diferentes combinaciones de proteínas fueron sometidas a crecimiento en medio sólido en dos condiciones experimentales diferentes: medio SD conteniendo un 2% de glucosa o medio bajo en glucosa (LG) conteniendo como fuentes de carbono un 0.05% de glucosa, 2% de glicerol, 2% de galactosa y 2% de etanol (Sanz et al. 2000). Como se muestra en la figura 23, todos los componentes de la familia ART, a excepción de Art3 y Art5, interaccionan con Bmh2 en las condiciones estudiadas.

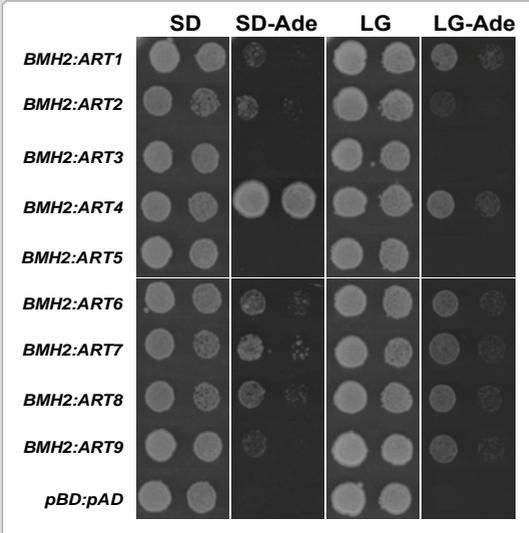
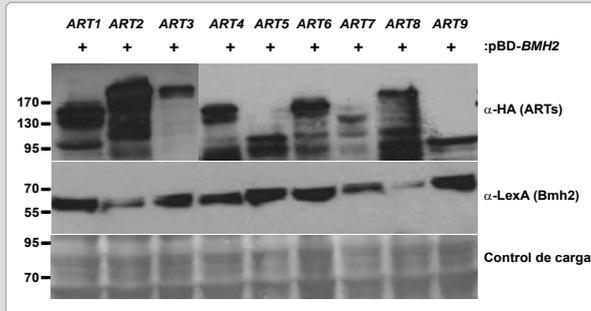


Figura 23. La proteína Bmh2 interactúa con gran parte de los miembros de la familia ART. Para la expresión de Bmh2 se utilizó el vector pBTM116 y en el caso de la familia ART el vector utilizado fue pACT2. Las cepas con las diferentes combinaciones de vectores se crecieron en medio líquido hasta alcanzar la saturación y posteriormente fueron sometidas a diluciones seriadas en agua y transferidas a medios sólidos SD y LG completos y medios SD y LG sin suplemento de adenina, donde el crecimiento es indicativo de la presencia de interacción física. Las imágenes fueron tomadas después de 48 horas de crecimiento a 28°C.

Figura 24. Análisis Western blot en el que se muestra la expresión de la proteína Bmh2 y los diferentes componentes de la familia ART. Con la expresión en el vector pACT2 y pBTM116 se obtuvieron las fusiones a los epítomos HA y LexA respectivamente. Mediante los anticuerpos anti-HA (ARTs) y anti-LexA (Bmh2) se detectó la expresión de las diferentes proteínas. La cantidad de proteína presente en cada muestra se observa en la membrana teñida con *Direct Blue* en el panel inferior. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

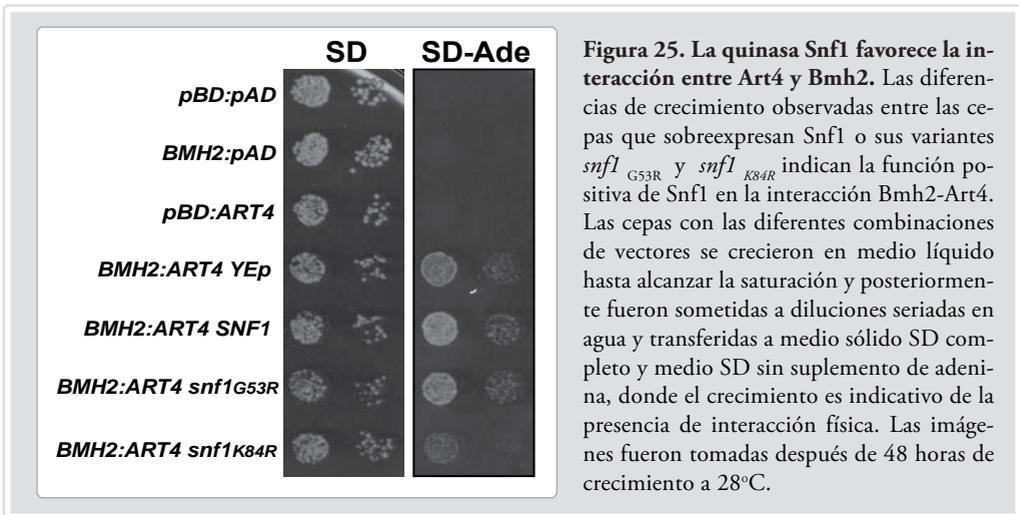


Observando con más detenimiento la figura 23, se pueden observar diferencias en el patrón de crecimiento entre los dos medios utilizados. Mientras que en medio SD, con un 2% de glucosa, la interacción más robusta es aquella entre Bmh2 y Art4, en medio LG las diferencias de crecimiento entre las cepas donde se observa interacción no parecen ser tan marcadas. Estos datos sugieren que la interacción entre Bmh2 y la familia ART podría estar sujeta a condiciones ambientales, del mismo modo que apuntan a un papel generalizado de Bmh2 en la regulación de las proteínas adaptadoras de Rsp5.

Como en los apartados anteriores, se procedió a la confirmación mediante *Western blot* de la correcta expresión de todas las proteínas implicadas en el anterior ensayo. Como se muestra en la figura 24, los patrones de bandas observados ratifican la validez del experimento.

1.4. Papel de Snf1 en la interacción entre Bmh2 y Art4.

Estudios precedentes demostraron la implicación de la quinasa Snf1 en la fosforilación de Art4 (Shinoda y Kikuchi, 2007). En base a estos datos y a los resultados obtenidos en el presente estudio, se hipotetizó que Snf1, al fosforilar a Art4, podría estar generando sitios de unión entre Bmh2 y Art4 puesto que las proteínas 14-3-3 muestran mayor afinidad por sustratos fosforilados. Así, se diseñó un ensayo de doble híbrido con el fin de caracterizar el papel de Snf1 en la interacción entre Bmh2 y Art4. Para ello, se sobreexpresó la quinasa Snf1 (pWS93-*SNF1*) y dos variantes de la misma, la forma hiperactiva *snf1*^{G53R} y la forma catalíticamente inactiva *snf1*^{K84R} (Mayordomo et al., 2003; Jiang y Carlson, 1996) en células co-transformadas con Bmh2 y Art4. La siguiente figura muestra los patrones de crecimiento de las diferentes cepas al ser enfrentadas al medio donde se selecciona la interacción Bmh2-Art4.



Como muestra la figura 25, se observan diferencias de crecimiento entre cepas que sobreexpresan Snf1 respecto a las que presentan niveles endógenos de la quinasa, así como también se observan diferencias de crecimiento entre las diferentes formas de Snf1, crecimiento que es indicativo de la robustez de la interacción entre Bmh2 y Art4 y que señala que la interacción se ve favorecida por la coexpresión con Snf1.

Tras observar los fenotipos de las diferentes cepas, se procedió al análisis de las mismas mediante *Western blot* para confirmar la correcta expresión de las proteínas implicadas en la interacción. En la figura 26 se pueden observar los patrones de bandas correspondientes a las diferentes cepas utilizadas en el ensayo de crecimiento, que validan las observaciones realizadas sobre el experimento anterior.

La cuantificación de los niveles de interacción entre Bmh2 y Art4 en función de la expresión de Snf1 así como de sus variantes se llevó a cabo mediante un análisis β -galactosidasa, que mediante colorimetría permite la estimación de la intensidad de la interacción representada en Unidades

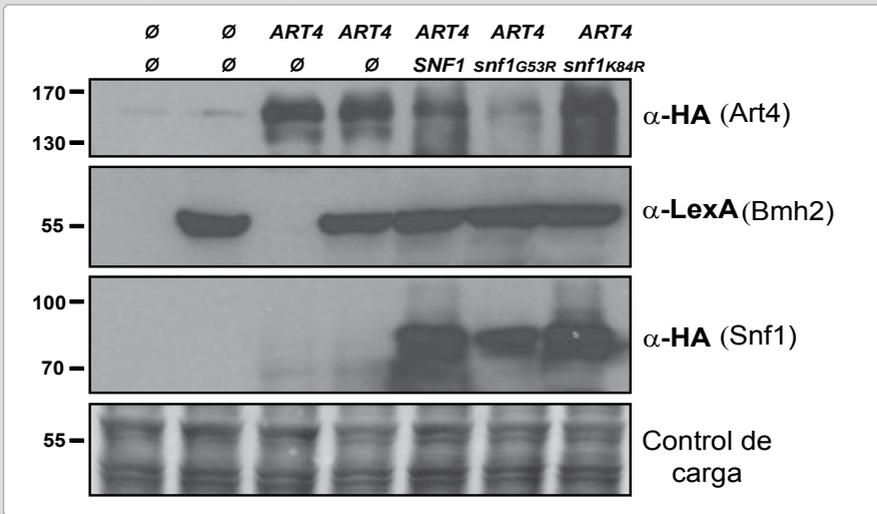


Figura 26. Análisis Western blot para la comprobación de la expresión de Bmh2, Art4 y las variantes de Snf1. Para la detección de las proteínas se utilizaron los anticuerpos anti-HA (Art4, Snf1) y anti-LexA (Bmh2). La cantidad de proteína presente en cada muestra se observa en la membrana teñida con *Direct Blue* en el panel inferior. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

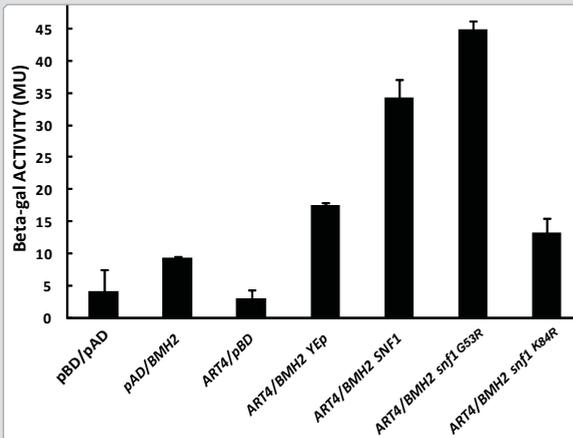


Figura 27. Cuantificación de la interacción entre Bmh2 y Art4 mediante ensayo β -galactosidasa en función de la co-expresión con Snf1 y sus variantes Snf1 ^{G53R} y Snf1 ^{K84R}, quinasa hiperactiva o inactiva respectivamente. Las barras de error corresponden a tres repeticiones técnicas. Se llevaron a cabo tres repeticiones biológicas obteniéndose resultados similares. Los resultados se expresan en Unidades Miller (MU).

Miller (MU). La figura 27 muestra la cuantificación de la interacción en las diferentes cepas utilizadas en los ensayos anteriores.

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de trabajo, según la cual Snf1 actúa como regulador de la interacción Bmh2-Art4, siendo la fosforilación de Art4 por parte de la quinasa que facilita su interacción con Bmh2, proteína conocida por su afinidad por sustratos fosforilados.

Para profundizar en el análisis de esta interacción, y puesto que los mismos autores (Shinoda and Kikuchi, 2007) describieron la fosforilación de la serina 447 como diana de Snf1, se generaron

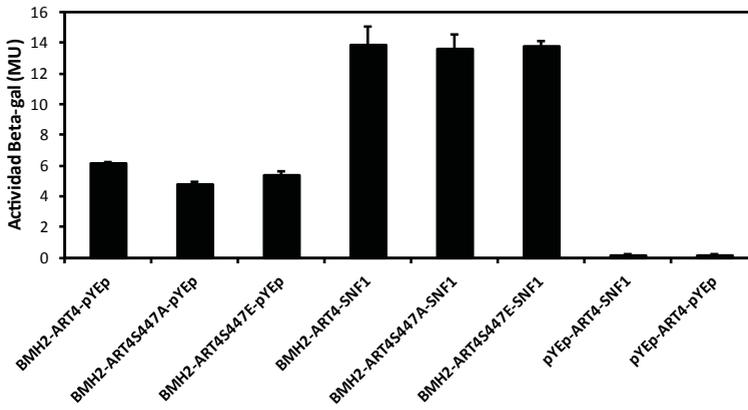


Figura 28. Cuantificación de la interacción entre Bmh2 y diferentes mutantes de Art4 mediante ensayo β -galactosidasa en función de la co-expresión con Snf1. Las mutaciones puntuales introducidas en la secuencia de Art4 consisten en la sustitución de la serina 447 por un aminoácido de alanina (Art4S447A) o por ácido glutámico (Art4S447E). El ensayo se llevó a cabo por triplicado con tres repeticiones técnicas en cada caso, obteniéndose resultados similares. Los resultados se expresan en Unidades Miller (MU).

mutaciones puntuales en la secuencia de Art4, donde se sustituyó la serina 447 por una alanina (aminoácido no fosforilable) o por un ácido glutámico (aminoácido que mimetiza la fosforilación en algunos contextos) con la finalidad de caracterizar su importancia en la interacción Bmh2-Art4. Las diferentes versiones mutantes de Art4 se co-expresaron junto con Bmh2 y Snf1 y se cuantificaron los niveles de interacción mediante un análisis β -galactosidasa. En la figura 28 se puede observar la ausencia de diferencias entre las diferentes versiones de Art4, sugiriendo que, aparte de la serina 447, pueden existir otras dianas de fosforilación que estén implicadas en la interacción entre Bmh2 y Art4 que sean suficientes para que la interacción Bmh2-Art4 se siga produciendo.

1.5. Mapeo de la interacción entre Art4 y Bmh2.

Analizados los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió llevar a cabo un mapeo de la interacción entre Art4 y Bmh2. Para ello, los dos extremos en los que se dividió Art4 (N-terminal y C-terminal) se enfrentaron a Bmh2 en un ensayo de doble híbrido. Como se contempla en la figura 29, la interacción con Bmh2 se produce en el extremo N-terminal de Art4. Este resultado sugiere la existencia de otro sitio de fosforilación que podría estar implicado en dicha interacción ya que, la serina 447, descrita como diana de fosforilación de Snf1 (Shinoda y Kikuchi, 2007) se encuentra localizada en el extremo C-terminal de Art4.

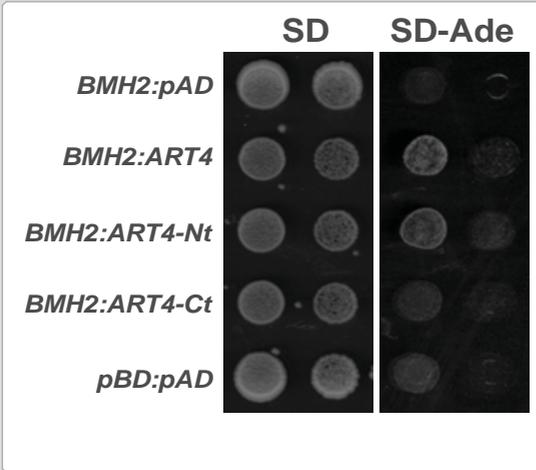


Figura 29. La proteína Art4 interacciona con Bmh2 a través de su extremo N-terminal. La proteína Bmh2 fusionada al dominio de unión a DNA (BD) se enfrentó a los extremos N-terminal y C-terminal de Art4 fusionados al dominio de activación transcripcional (AD). El crecimiento en medio SD carente de adenina de la combinación *BMH2-ART4-Nt* indica que la interacción física entre estas dos proteínas se produce a través del extremo N-terminal de Art4 y Bmh2. Las imágenes fueron tomadas después de 48 horas de crecimiento a 28°C.

2. Papel del complejo Snf1 - Art4 - 14-3-3 en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6.

Una vez expuesto el modelo de interacciones Art4-Snf1-14-3-3, y basándonos en estudios anteriores donde queda demostrada la interacción genética entre Hxt6 y Art4 (Nikko y Pelham, 2009), el siguiente paso fue caracterizar la posible implicación de este complejo en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6. Con la finalidad de esclarecer la posible interacción física entre Hxt6 y Art4, interacción de la que no existen referencias anteriores, y el papel que en esta juegan las proteínas Snf1 y Bmh2, se decidió llevar a cabo una serie de experimentos orientados a demostrar la existencia de dicha relación física. Con este objetivo, se utilizaron diferentes aproximaciones, como la técnica Split-Trp, ensayos de co-inmunoprecipitación y la técnica BiFC.

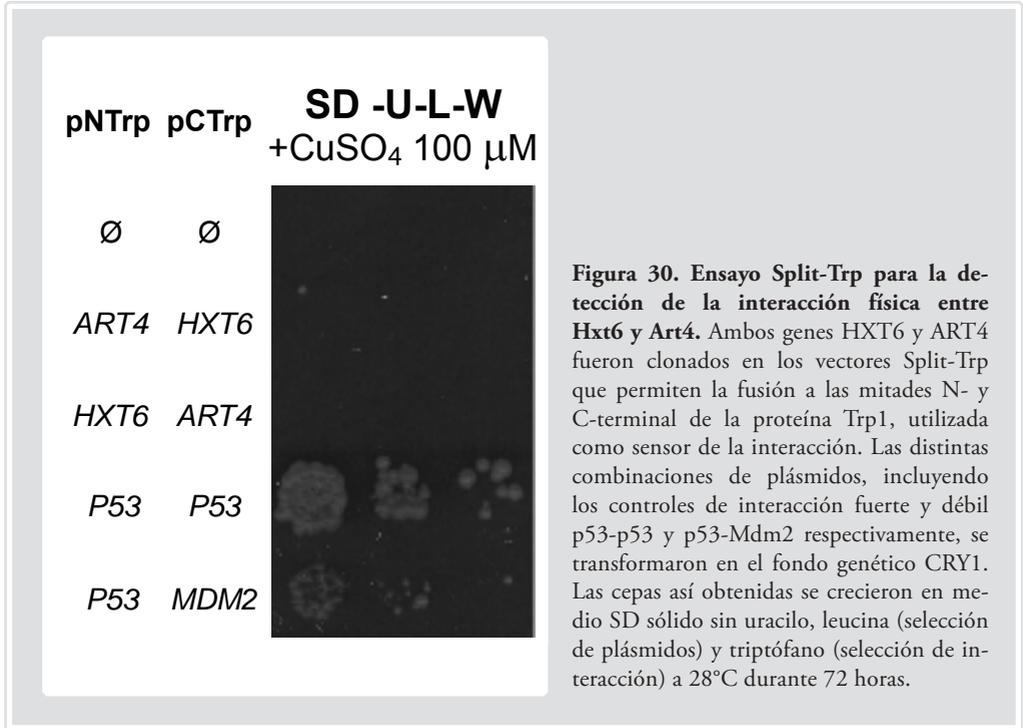
2.1 Interacción física entre Art4-Hxt6. Abordaje Split-Trp.

Como se ha comentado anteriormente, una de las limitaciones de los ensayos de doble híbrido es el estudio de las proteínas integrales de membrana, como los transportadores de membrana plasmática. La imposibilidad de que tras una interacción entre proteínas el complejo BD-AD viaje al núcleo para activar la transcripción del 'gen chivato' debido a que uno de los dos componentes se encuentra anclado a la membrana plasmática, hace esta técnica poco eficaz en términos fisiológicos para el análisis de interacciones en las que se encuentran implicadas proteínas de membrana.

Para satisfacer esta carencia experimental se desarrolló la técnica Split-Trp (ver anexo 1), basada en el reensamblaje de la enzima Trp1, implicada en la ruta de síntesis del triptófano y que servirá como reportero ante la existencia de una interacción entre proteínas. La descripción del modo en que Trp1 se podía convertir en un sensor de interacción entre proteínas (Tafelmeyer et al., 2004) permitió el desarrollo de la técnica Split-Trp, en la que fundamentalmente se fusiona a cada una de las proteínas objeto de estudio una de las dos partes en las que puede ser dividido el sensor, de manera que tras la interacción entre proteínas diana se reconstituye la enzima funcional y por tanto las células que carecen del gen endógeno *TRP1* pueden crecer en ausencia de triptófano.

Para el estudio de la interacción física entre Art4 y Hxt6 se clonaron los dos genes en los vectores Split-Trp, el pNTrp y el pCTrp, mediante enzimas de restricción (SfiI) y ligación. Ambos genes fueron clonados en ambos vectores, permitiendo así ensayar las dos combinaciones de fusiones posibles. Se incluyeron los controles necesarios para confirmar la validez de la técnica, un sistema control de interacción fuerte, p53-p53, y un control de interacción débil como es p53-Mdm2. Las combinaciones de los diferentes vectores se transformaron en la cepa CRY1 (*trp1*) y se estudió el crecimiento en medio carente de triptófano. Como se puede observar en la figura 30 el método Split-Trp no aporta datos positivos sobre la interacción física entre Hxt6-Art4.

Ambas combinaciones de vectores y genes, con sus respectivas proteínas de fusión (Hxt6-NTrp/CTrp, Art4-Ntrp/CTrp), resultaron negativas en células co-transformadas, ya que no presentaron capacidad de crecimiento en medio sin triptófano.



Este resultado podría estar indicando o bien que no se produce interacción física entre Art4 y Hxt6, o bien que el sistema no es lo suficientemente sensible en este caso como para detectar la interacción entre ambas proteínas. Por otra parte los controles internos del sistema, la interacción p53-p53 y p53-Mdm2, sí muestran la interacción en ambos casos, demostrando así que el sistema es eficaz para la detección de algunas interacciones.

2.2. Interacción entre Hxt6-Art4 y función de Snf1 y Bmh2 mediante co-inmunoprecipitación.

Para la realización del ensayo de co-inmunoprecipitación, en primer lugar se fusionó el transportador de glucosa a un péptido que proviene de la proteína hemaglutinina (HA), etiqueta que se utilizaría para la inmunoprecipitación y posterior detección de Hxt6. Del mismo modo, se fusionó Art4 a una etiqueta V5 destinada a la detección de esta proteína en aquellas condiciones en las que co-inmunoprecipitara con Hxt6. Estas dos fusiones se obtuvieron clonando los genes HXT6 y ART4 en los vectores pNTrp y pCTrp respectivamente. En este ensayo se utilizaron

además los vectores pNLexA-*SNF1* (proteína de fusión Snf1-LexA) y pUG34-*BMH2-VC* (proteína de fusión Bmh2-VC detectable con el anticuerpo α -GFP) así como los respectivos vectores vacíos. Diferentes combinaciones de estos vectores fueron co-transformadas en la cepa BY4741, siendo la base de este ensayo la expresión de Hxt6 y Art4 y adicionalmente la sobreexpresión de Snf1 y Bmh2 con el objetivo de entender su papel en esta interacción. Las cepas triple transformantes así generadas, y sus respectivos controles negativos, se crecieron en medio SD usando rafinosa 2% como fuente de carbono para asegurar la estabilidad de Hxt6 en la membrana, y se sometieron o no a la adición de glucosa 2%, ya que nuestra hipótesis de partida era que ambas proteínas interaccionarían en respuesta al cambio de fuente de carbono o lo que es lo mismo, a la adición de glucosa al medio. En presencia de glucosa, el transportador de alta afinidad dejaría de ser necesario y se procedería a su endocitosis y posterior degradación, mecanismo en el que sería necesaria su interacción con Art4 que facilitarían su ubiquitinación. El ensayo de co-inmunoprecipitación, donde se inmunoprecipitó Hxt6-HA y se comprobó si Art4-V5 co-inmunoprecipitaba con el transportador, se realizó según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos y el resultado se muestra en la figura 31.

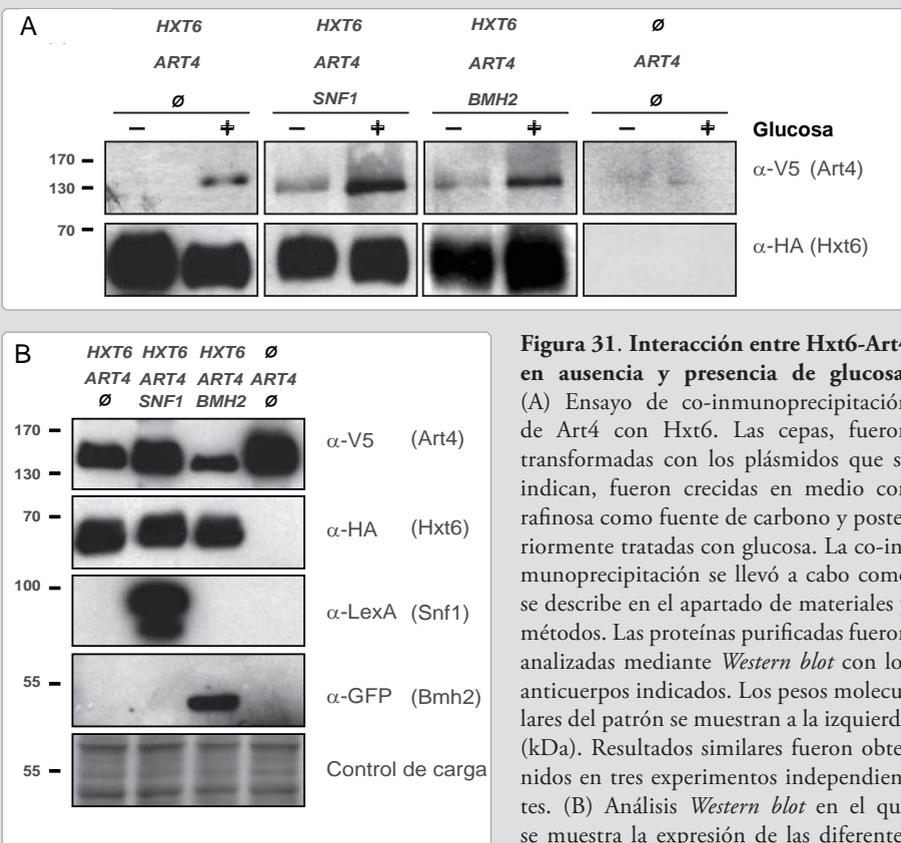


Figura 31. Interacción entre Hxt6-Art4 en ausencia y presencia de glucosa.

(A) Ensayo de co-inmunoprecipitación de Art4 con Hxt6. Las cepas, fueron transformadas con los plásmidos que se indican, fueron crecidas en medio con rafinosa como fuente de carbono y posteriormente tratadas con glucosa. La co-inmunoprecipitación se llevó a cabo como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las proteínas purificadas fueron analizadas mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados. Los pesos moleculares del patrón se muestran a la izquierda (kDa). Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes. (B) Análisis *Western blot* en el que se muestra la expresión de las diferentes proteínas en las células que posteriormente fueron utilizadas para el ensayo de la co-inmunoprecipitación..

Como se observa en la figura 31(A), la co-inmunoprecipitación de Hxt6 y Art4 se produce en respuesta a tratamiento con glucosa 2% en aquellas células donde únicamente ambas proteínas son co-expresadas. En cepas donde además se incluye la expresión de Snf1 o Bmh2 se puede observar la co-inmunoprecipitación de Hxt6 y Art4 tanto en células crecidas en rafinosa como tras la adición de glucosa 2%, aunque en esta segunda condición se observa un importante enriquecimiento de la banda correspondiente a Art4, fenómeno que se puede traducir como un incremento de la interacción entre Hxt6 y Art4 en respuesta a cambio de fuente de carbono. Los resultados confirman en primer lugar que la interacción física entre Hxt6 y Art4 se produce como resultado de la adición de glucosa a las células en crecimiento y que este mismo fenómeno se observa cuando Snf1 y Bmh2 son sobreexpresadas, aunque en estas condiciones los datos apuntan a que la interacción ya se produce previamente cuando las células son crecidas en rafinosa. En general estos resultados apoyan la hipótesis de la existencia de una interacción física entre Hxt6 y Art4 y demuestran que tanto Snf1 como Bmh2 tienen un efecto en su establecimiento. La figura 31(B) muestra la correcta expresión de las proteínas estudiadas en las diferentes cepas.

Es importante remarcar que en este experimento se ha empleado un *cross-linker* (ver materiales y métodos), cuya función es crear un enlace covalente entre proteínas que se encuentran a menos de 12 angstroms de distancia. Este abordaje resulta necesario ya que para la recuperación de proteínas integrales de membrana, como Hxt6, para su posterior análisis bioquímico es necesario solubilizar con detergentes, condiciones a las cuales la mayoría de interacciones proteína-proteína no son resistentes. Aunque imprescindible en este contexto, este protocolo puede llevar a artefactos, por lo que se planteó confirmar los resultados con un abordaje adicional que se describe a continuación.

2.3. Interacción entre Hxt6-Art4 y función de Snf1 y Bmh2 mediante BiFC

Con el fin de confirmar la interacción entre Hxt6 y Art4 observada en el apartado anterior, se llevó a cabo un ensayo de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*). Mediante la utilización de esta técnica la interacción de dos proteínas se puede visualizar a través de la reconstitución de una proteína fluorescente, la proteína Venus en este caso, que será dividida en dos mitades que por sí solas no presentan fluorescencia (la mitad VN o N-terminal y la mitad VC o C-terminal) y que serán fusionadas a las dos proteínas candidatas para el establecimiento de una interacción física, interacción que de ocurrir se traducirá en la recuperación de la señal fluorescente. El valor añadido que presenta esta técnica es que permite tanto la visualización *in vivo* como la localización subcelular de la interacción proteína-proteína. Como se describe en el apartado de materiales y métodos, las dos mitades en las que se divide la proteína fluorescente Venus se fusionaron a nivel genómico mediante recombinación homóloga para marcar el extremo C-terminal de los genes *HXT6* y *ART4* en el fondo genético BY4741. Solo la cepa que presentaba las proteínas de fusión Hxt6-VC y Art4-VN demostró ser válida para esta aproximación. Las cepas que tras su comprobación por PCR resultaron ser positivas, se crecieron en medio mínimo MY con rafinosa

2% como fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial. Después de ser observadas por microscopía confocal, considerando este punto del experimento como tiempo 0 ($t=0$), se sometió a las mismas a tratamiento basado en la adición de glucosa a una concentración final del 2%. A continuación las células se analizaron de nuevo por microscopía confocal transcurridos 30 y 60 minutos ($t=30$, $t=60$). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

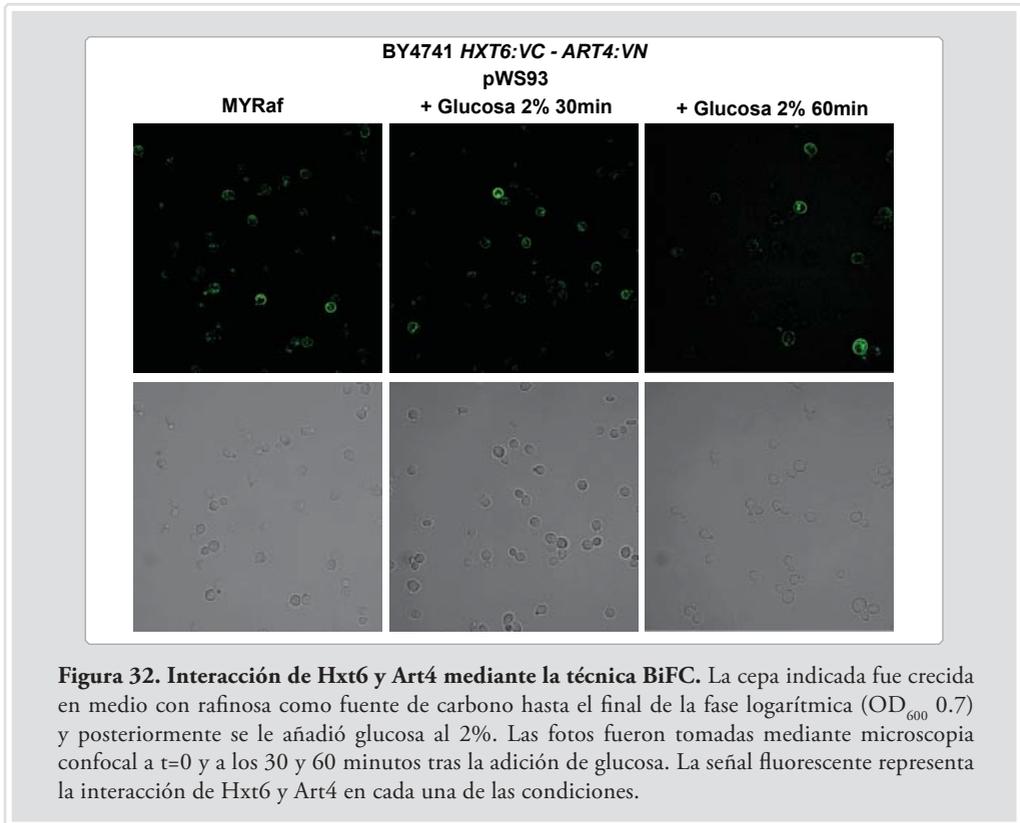


Figura 32. Interacción de Hxt6 y Art4 mediante la técnica BiFC. La cepa indicada fue crecida en medio con rafinosa como fuente de carbono hasta el final de la fase logarítmica (OD_{600} 0.7) y posteriormente se le añadió glucosa al 2%. Las fotos fueron tomadas mediante microscopía confocal a $t=0$ y a los 30 y 60 minutos tras la adición de glucosa. La señal fluorescente representa la interacción de Hxt6 y Art4 en cada una de las condiciones.

Como se muestra en la figura 32, en las cepas generadas para BiFC se observó señal de la interacción Hxt6-Art4 en todos los tiempos testados ($t=0$, $t=30$, $t=60$), señal que se encuentra localizada principalmente en la membrana plasmática y, en menor medida, en compartimentos intracelulares. Atendiendo a trabajos realizados previamente (Becuwe et al., 2012) cabría esperar que esta interacción se produjese después de la adición de glucosa, siendo esta la señal que desencadenaría la endocitosis del transportador Hxt6. La glucosa originaría la interacción de Hxt6 con la proteína adaptadora de Rsp5, Art4, para favorecer su ubiquitinación y posterior entrada en la ruta ESCRT de modo similar a como se planteó para el transportador de lactato Jen1. De modo opuesto, nuestros resultados muestran como esta interacción ya ocurre previamente a la adición de glucosa, fenómeno que podría estar sugiriendo un rol de Art4 no solo en la endocitosis del transportador, sino también en su estabilidad, funcionalidad o llegada a la membrana. Como controles negativos se utilizaron las cepas marcadas en *HXT6* o *ART4* únicamente con uno de los fragmentos de la proteína Venus, cepas que fueron transformadas con los vectores vacíos

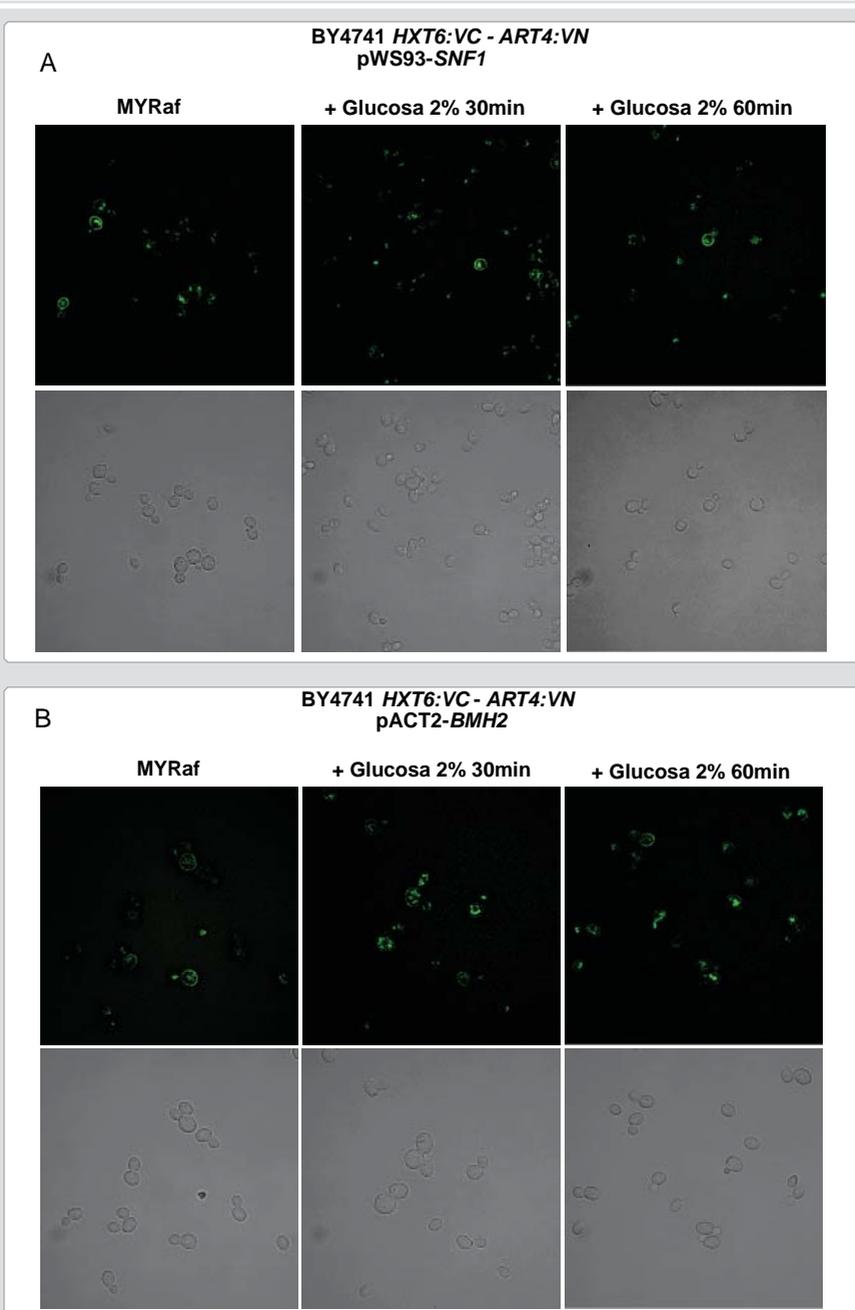


Figura 33. La sobreexpresión de Snf1 (A) y Bmh2 (B) tienen un efecto sobre la interacción Hxt6-Art4. Las cepas indicadas, generadas como se describe en materiales y métodos, se crecieron en medio con rafinosa como fuente de carbono hasta el final de la fase logarítmica (OD_{600} 0.7) y posteriormente se les añadió glucosa a una concentración final del 2%. Las células se analizaron mediante microscopía confocal a $t=0$, $t=30$ y $t=60$ tras la adición de glucosa y se estudió la presencia de la interacción Art4-Hxt6 y su localización.

portadores del fragmento complementario pUG35-VN o pUG35-VC. En ambos casos no se observó señal de interacción.

Con el objetivo de examinar el efecto que Snf1 y Bmh2 tienen *in vivo* en la interacción Hxt6-Art4, el siguiente paso fue la sobreexpresión de estas dos proteínas en la cepa BiFC analizada en la figura 32 mediante los plásmidos pWS93-SNF1 y pACT2-BMH2. Las nuevas cepas así obtenidas se crecieron en las mismas condiciones que en el experimento anterior y los resultados se muestran y analizan a continuación.

Como se puede observar en las figuras 33(A) y 33(B), existen desde el principio ($t=0$) diferencias entre las tres cepas, es decir, entre células transformada con el vector vacío (Figura 32) y aquellas donde se sobreexpresa tanto Snf1 como Bmh2. Estas diferencias se hacen patentes principalmente en la señal de fluorescencia observada en la membrana plasmática. Mientras que en las células transformadas con el vector vacío se puede observar casi la totalidad de la señal localizada en la membrana, en aquellas transformadas tanto con Snf1 como con Bmh2 la distribución de la señal tiende a estar deslocalizada, siendo más abundante en el interior de la célula. Este fenómeno demuestra la implicación de Snf1 y Bmh2 tanto en la localización como en el establecimiento de la interacción Hxt6-Art4 y refuerza los datos obtenidos anteriormente mediante co-inmunoprecipitación, donde Snf1 y Bmh2 demostraban su influencia en la interacción entre transportador y arrestina. Del mismo modo, existen diferencias entre las tres cepas en respuesta a la adición de glucosa, pudiéndose observar señal en la membrana plasmática aunque con importantes diferencias al comparar las cepas transformadas con SNF1 y BMH2 (Figura 33) respecto a las células que no sobreexpresan estas proteínas (Figura 32). Mientras que en las células portadoras del vector se sigue observando la señal de interacción principalmente en la membrana plasmática, en las cepas de sobreexpresión siguen sin producirse cambios importantes en la localización de la interacción, indicando un posible rol de Snf1 y Bmh2 en la respuesta a glucosa. Para llevar a cabo un mejor análisis de la interacción Hxt6-Art4 y del papel que Snf1 y Bmh2 juegan en ella, se procedió a la cuantificación de la señal observada mediante técnicas de análisis de imagen.

2.3.1. Cuantificación de la señal de interacción Hxt6-Art4.

Los ensayos de BiFC nos muestran un cambio en la localización de la señal entre las diferentes cepas, aunque resulta difícil de interpretar si hay una mayor o menor presencia de la misma en función del tiempo transcurrido después de la adición de glucosa. Con el objetivo de cuantificar la señal presente en las células y con la finalidad de tener una representación gráfica de los datos, se procedió al análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal utilizando el programa de análisis de imágenes Fiji (ImageJ), como se describe en el apartado de materiales y métodos. De esta manera, se cuantificaron los niveles de fluorescencia presentes en la membrana plasmática en las diferentes condiciones experimentales y se pudo hacer el estudio comparativo entre las distintas cepas objeto de estudio. Para ello, los datos se representan, después de su procesamiento, en porcentaje de fluorescencia presente en la membrana plasmática y las cifras obtenidas se reproducen en forma de gráficos.

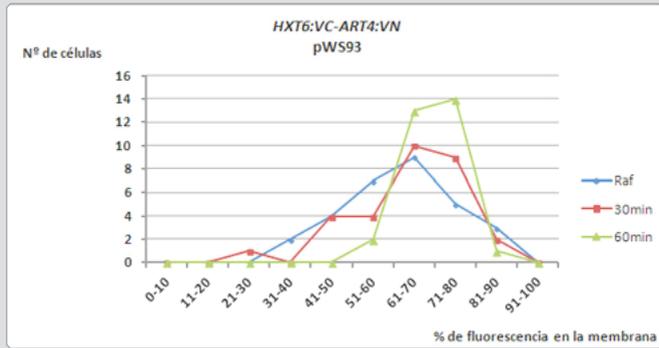


Figura 34. Cuantificación de la señal BiFC en la cepa *HXT6:VC-ART4:VN*. La cepa indicada se creció en medio con rafinosa como fuente de carbono y fue tratada con glucosa 2% durante los tiempos indicados. 30 células de cada una de las condiciones y tiempos fueron analizadas con el programa ImageJ para determinar la intensidad de fluorescencia interna y de fluorescencia total. Los datos representan el número de células con el indicado porcentaje de fluorescencia en la membrana plasmática, calculados como se describe en materiales y métodos. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

En la figura 34 se puede observar como prácticamente la totalidad de las células analizadas presentan señal de interacción en la membrana plasmática cuando son crecidas en medio con rafinosa 2% ($t=0$), donde dos tercios de las células presentan entre el 51 y el 80% de la fluorescencia total en la membrana plasmática. Estos datos son un indicativo de que la interacción Hxt6-Art4 no necesita del estímulo de cambio de fuente de carbono de rafinosa a glucosa para producirse, sino que la interacción entre transportador y arrestina ya se produce previamente. En estas mismas células se puede observar además el incremento de la interacción después de la adición de glucosa al medio de crecimiento, presentándose el pico máximo tras 60 minutos de suplementar el medio con glucosa, donde prácticamente la totalidad de células analizadas presentan entre el 61 y el 80% de su fluorescencia total en la membrana. Esto concuerda con el modelo propuesto anteriormente (Becuwe et al. 2012) para el transportador Jen1, en el que sugieren que la interacción entre Jen1 y Art4 se produce como consecuencia de la adición de glucosa al medio, y por tanto cuando el transportador ha de ser ubiquitinado para su posterior endocitosis. Nuestras observaciones indican que más que producirse la interacción tras la adición de glucosa lo que ocurre es un incremento de la misma tras el cambio en la fuente de carbono. Es importante remarcar que, en el estudio mencionado, no se presentaron datos sobre la interacción de Art4 con el transportador Jen1.

En la figura 35 se presentan los resultados correspondientes a la cepa de BiFC transformada con el plásmido de sobreexpresión pWS93-SNF1. En nuestra observación preliminar apreciábamos una distribución diferente de la fluorescencia respecto a células que no sobreexpresaban Snf1. En este caso, en las células crecidas en medio con rafinosa se observa como más de dos tercios de las células sometidas a análisis presentan entre el 31 y el 60% de la señal en la membrana, confirmado la existencia de la interacción previamente a la adición de glucosa aunque los rangos de fluorescencia son menores si se comparan con el gráfico anterior. Tras la adición de glucosa al

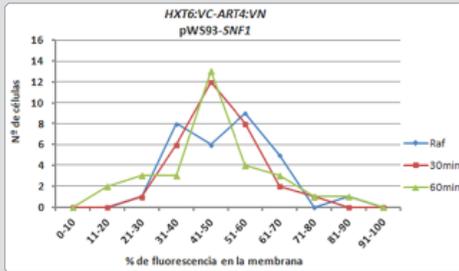


Figura 35. Cuantificación de la señal BiFC en la cepa *HXT6:VC-ART4:VN pWS93-SNF1*.

La cepa indicada se creció en medio con rafinosa como fuente de carbono y fue tratada con glucosa 2% durante los tiempos indicados. 30 células de cada una de las condiciones fueron analizadas con el programa ImageJ para determinar la intensidad de fluorescencia interna y de fluorescencia total. Los datos representan el número de células con el porcentaje de fluorescencia en la membrana plasmática indicado y calculado como se describe en materiales y métodos. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

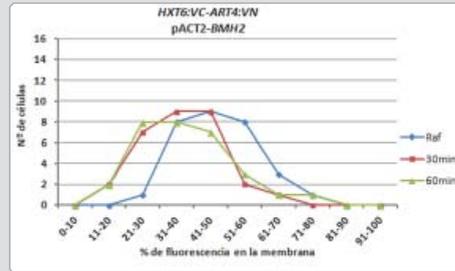


Figura 36. Cuantificación de la señal BiFC en la cepa *HXT6:VC-ART4:VN pACT2-BMH2*.

La cepa indicada se creció en medio con rafinosa como fuente de carbono y fue tratada con glucosa 2% durante los tiempos indicados. 30 células de cada una de las condiciones fueron analizadas con el programa ImageJ para determinar la intensidad de fluorescencia interna y de fluorescencia total. Los datos representan el número de células con el porcentaje de fluorescencia indicado en la membrana plasmática y calculado como se describe en materiales y métodos. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

medio de crecimiento se observan cambios en la interacción Hxt6-Art4, sin embargo los valores de fluorescencia en la membrana se mantienen prácticamente inalterados transcurridos 30 y 60 minutos, siendo menores que los observados en la figura 34 tras suplementar el medio con glucosa. Estos datos refuerzan la hipótesis de la implicación de Snf1 en la interacción entre Hxt6 y Art4 y de su papel de regulador negativo en el proceso de endocitosis del transportador.

La figura 36 se corresponde con las células *HXT6:VC-ART4:VN* transformadas con el plásmido *pACT2-BMH2*. En él se puede observar, al igual que en los gráficos anteriores, la existencia de la interacción Hxt6-Art4 en células crecidas en rafinosa 2%, aunque de nuevo con porcentajes de señal en la membrana menores que en la cepa portadora del vector vacío. A diferencia de esta, en la cepa de sobreexpresión de Bmh2 no se observa un incremento en la fluorescencia presente en la membrana tras la adición de glucosa al medio, fenómeno que se traduce como ausencia de cambios significativos en la interacción Hxt6-Art4 y de haberlos, la curva tiende a mostrar una menor interacción si las comparamos con la curva que corresponde al crecimiento en rafinosa 2%. Estos datos reflejan el efecto de Bmh2 en la interacción Hxt6-Art4; dificulta la interacción entre ambas proteínas en respuesta a glucosa y por tanto compromete la ubiquitinación de Hxt6, al mismo tiempo que influye en la localización subcelular del complejo Hxt6-Art4.

2.4. Análisis del papel de Snf1 y Bmh2 en la regulación de Hxt6 en respuesta a cambios en la fuente de carbono.

Con el análisis de los resultados anteriores se aportan nuevos datos sobre el papel de Snf1 y Bmh2 en el establecimiento de la interacción Hxt6-Art4; ambos intervienen en la formación del complejo y afectan a su localización nativa pudiendo tener efectos sobre la ubiquitinación y degradación de Hxt6. Para analizar su función mediante una aproximación diferente se diseñó el siguiente experimento cuyo objetivo es el de observar el efecto de Snf1 y Bmh2 en la acumulación de Hxt6. Con este fin, se generó la cepa *HXT6-GFP* en el fondo genético BY4741, cepa en la que se insertó a nivel genómico y por recombinación homóloga la pauta abierta de lectura de la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo C-terminal del gen *HXT6*, permitiendo de este modo el seguimiento del transportador bajo el control de su propio promotor. Una vez obtenida y validada, se transformó con los mismos vectores utilizados en el experimento de BiFC (pWS93- \emptyset , pWS93-*SNF1* y pACT2-*BMH2*). Las cepas así generadas se crecieron en medio SD conteniendo un 2% de rafinosa como única fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial (DO_{600} 0.5), tomado muestras en este punto ($t=0$) y después de 1 y 2 horas tras suplementar el medio con glucosa 2%. Las muestras así obtenidas fueron procesadas y los extractos crudos se examinaron mediante *Western blot*. El resultado de este análisis se presenta en la siguiente figura.

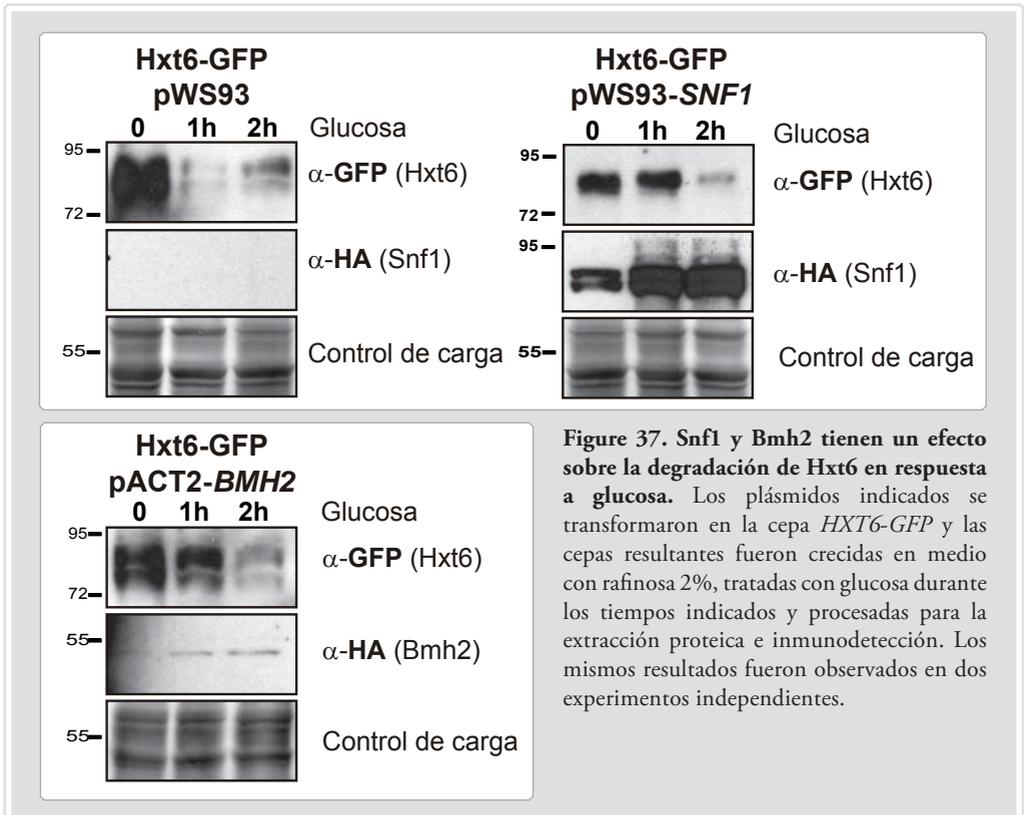


Figure 37. Snf1 y Bmh2 tienen un efecto sobre la degradación de Hxt6 en respuesta a glucosa. Los plásmidos indicados se transformaron en la cepa *HXT6-GFP* y las cepas resultantes fueron crecidas en medio con rafinosa 2%, tratadas con glucosa durante los tiempos indicados y procesadas para la extracción proteica e inmunodetección. Los mismos resultados fueron observados en dos experimentos independientes.

Como se contempla en la figura 37, en respuesta a la adición de glucosa se observa una disminución de la cantidad de Hxt6 dependiente de tiempo en la cepa silvestre, como ya se demostró en estudios anteriores (Nikko y Pelham, 2009). Sin embargo, en cepas que sobreexpresan Snf1 y Bmh2 existe un retraso en el tiempo de reducción de la señal de Hxt6. Estos resultados están en concordancia con los experimentos realizados previamente y sugieren que esta demora está causada por una menor tasa de ubiquitinación del transportador Hxt6 por parte de Rsp5, cuya interacción con el transportador es Art4-dependiente y que se verá dificultada en cepas que sobreexpresan Bmh2 (Becuwe et al., 2012) y Snf1. Como también se pudo observar, la localización del complejo Hxt6-Art4 en células que expresan Snf1 y Bmh2 se encuentra alterada, fenómeno que muy probablemente influirá en la correcta ubiquitinación y degradación de Hxt6. Debido a la deslocalización del complejo, la eficiencia en la ubiquitinación de Hxt6 puede verse afectada, dificultando su correcto marcaje y por tanto prolongando el tiempo necesario para su degradación.

Con los resultados obtenidos a lo largo de los apartados anteriores, queda demostrada la existencia de una interacción física entre el transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 y la proteína Art4, perteneciente a la familia de adaptadores de Rsp5 y cuya función es la de facilitar la ubiquitinación de Hxt6 en respuesta a cambios ambientales. Del mismo modo, se ha demostrado la implicación de las proteínas Snf1 y Bmh2 en el establecimiento de la interacción Hxt6-Art4 al mismo tiempo que se han descrito sus efectos sobre la acumulación intracelular del complejo.

2.5. Implicación de Art4 y Art7 en la endocitosis de Hxt6.

La elevada similitud de secuencia entre Art4 y Art7, además de los resultados obtenidos y analizados en apartados anteriores, incitan a considerar la posibilidad de que Art7 esté también implicado en la regulación de la endocitosis del transportador Hxt6 de un modo similar a Art4. Con el fin de intentar demostrar la posible implicación de Art7, se generaron las cepas *art7 HXT6:GFP* y el doble mutante *art4 art7 HXT6:GFP*. Las nuevas cepas generadas, junto con la cepa silvestre y la cepa *art4*, fueron crecidas en medio SD líquido usando rafinosa como fuente de carbono y posteriormente se añadió glucosa 2% durante el tiempo indicado (4 horas), estímulo que desencadena la endocitosis de Hxt6. Las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia y la localización subcelular de Hxt6-GFP para cada una de las condiciones se muestra en la siguiente figura.

Como se observa en la figura 38, los mutantes *art4*, *art7* y el doble mutante *art4 art7* presentan deficiencias en la endocitosis de Hxt6, puesto que tras cuatro horas de exposición a concentraciones altas de glucosa la señal de GFP correspondiente al transportador sigue localizada en la membrana plasmática. Por el contrario, en la cepa silvestre sí se observa la señal en compartimentos intracelulares, probablemente formando parte de la vacuola o de cuerpos multivesiculares. Estos

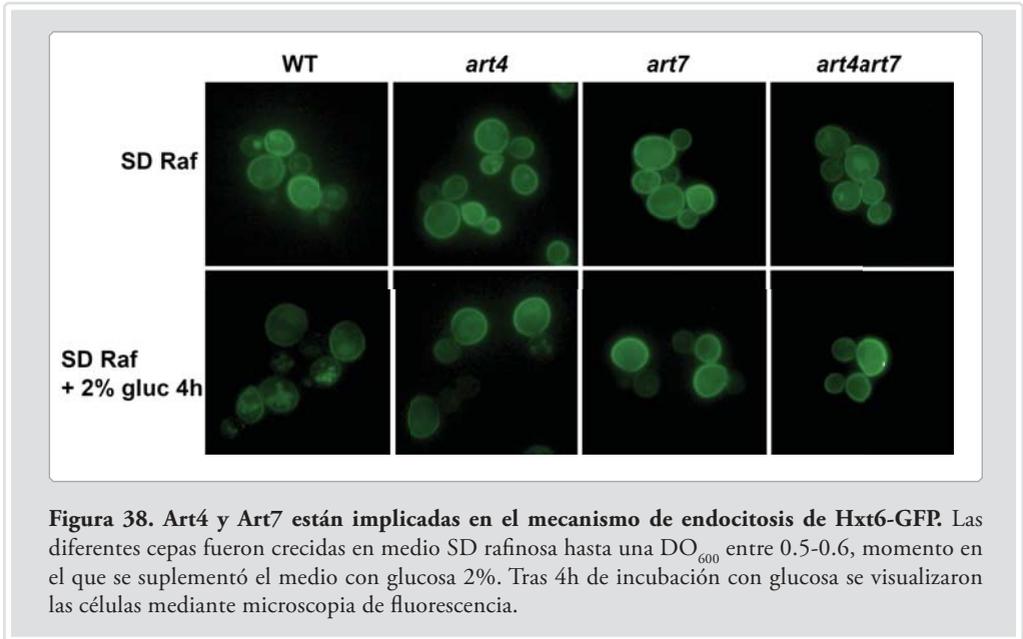


Figura 38. Art4 y Art7 están implicadas en el mecanismo de endocitosis de Hxt6-GFP. Las diferentes cepas fueron crecidas en medio SD rafinosa hasta una DO_{600} entre 0.5-0.6, momento en el que se suplementó el medio con glucosa 2%. Tras 4h de incubación con glucosa se visualizaron las células mediante microscopia de fluorescencia.

resultados muestran como además de Art4, Art7 también se encuentra implicada en el mecanismo de endocitosis de Hxt6, al mismo tiempo que queda demostrada la función no redundante de Art4 y Art7 a nivel fisiológico, puesto que la carencia tanto de una proteína como de otra es suficiente para interrumpir la correcta endocitosis del transportador, fenotipo que se mantiene en el doble mutante sin, aparentemente, cambios significativos que pudiesen indicar efectos aditivos o de sinergia entre estas dos proteínas. Por lo tanto, del mismo modo que Art4 tiene un papel en el proceso de endocitosis de Hxt6, Art7 también parece estar involucrado en el mismo mecanismo y muy probablemente con una función similar.

2.6. Implicación de Art4 y Art7 en la acumulación de Hxt6.

Para estudiar la relevancia fisiológica del mecanismo de regulación de Hxt6 en el que se encuentran implicadas Art4 y Art7, se procedió a analizar la acumulación celular del transportador de glucosa de alta afinidad en los diferentes fondos genéticos así como en diferentes condiciones de crecimiento. Para ello, las cepas silvestre, *art4* y *art7* *HXT6-GFP* fueron crecidas en medio líquido YPD e YPRaf (2% glucosa y 2% rafinosa respectivamente) y se siguió la cinética de acumulación del transportador en células en fase exponencial temprana (DO_{600} 0.5), tardía (DO_{600} 1.0) y en fase estacionaria (DO_{600} 3.0). Tras la recogida y procesamiento, las muestras se sometieron a análisis *Western blot* y la señal de GFP se cuantificó utilizando fluorimetría. Los resultados se muestran a continuación.

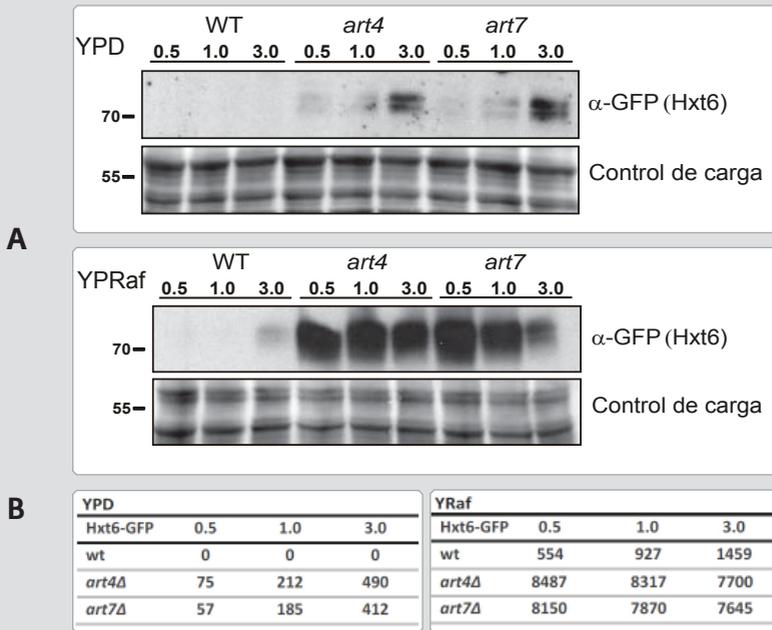


Figura 39. Art4 y Art7 tienen un efecto sobre la acumulación de Hxt6-GFP en diferentes condiciones de crecimiento. La secuencia codificante de GFP se insertó en el genoma después del último aminoácido codificado por *HXT6* en la cepa wt, *art4* y *art7*. Las células fueron crecidas en las condiciones indicadas y utilizadas para determinar la cantidad de Hxt6-GFP en extractos crudos mediante inmunodetección (A) o para cuantificar la señal de Hxt6-GFP mediante fluorimetría (B) como se describe en materiales y métodos. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda y la tinción de la membrana con 'direct blue' se utilizó como control de carga. Resultados similares se observaron en dos experimentos independientes.

Tal y como muestran los resultados en la figura 39, la cantidad de Hxt6 presenta alteraciones en los mutantes *art4* y *art7* crecidos tanto en YPD como en YPRaf. El análisis de las cepas crecidas en 2% glucosa muestra una acumulación temprana de Hxt6 en ambos mutantes en comparación con la cepa silvestre, donde incluso en fase estacionaria los niveles de Hxt6 son indetectables. Sin embargo, tanto en el mutante *art4* como en el *art7* la banda correspondiente a Hxt6 es ya observable en fase exponencial temprana donde los niveles de glucosa no favorecen aún la expresión del transportador de alta afinidad Hxt6, como se aprecia en la cepa silvestre. En células crecidas en medio con 2% rafinosa la expresión de Hxt6 aparece también afectada. En este medio con baja glucosa disponible se favorece la acumulación de Hxt6 en la membrana plasmática. Al ser comparados los niveles de transportador en los mutantes *art4* y *art7* con respecto a la cepa silvestre, se observan cantidades anómalas de transportador en las cepas mutantes, que suponen un incremento de hasta 8 veces en los niveles observados en la cepa control.

El mismo experimento se llevó a cabo en células crecidas en medio mínimo MY 2% rafinosa utilizando idénticas cepas y adicionalmente se incluyó la cepa doble mutante *HXT6-GFP art4 art7* con la intención de comprobar si el fenotipo observado en los mutantes simples se veía

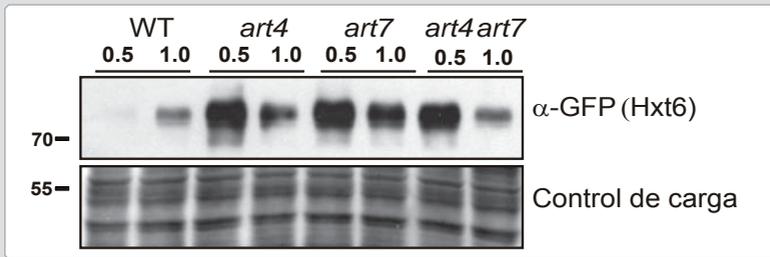


Figura 40. Art4 y Art7 tienen un efecto sobre la acumulación de Hxt6-GFP en medio MYRaf. La secuencia codificante de GFP se insertó en el genoma después del último aminoácido codificado por *HXT6* en las cepas mencionadas. Las células fueron

crecidas en medio mínimo MY con rafinosa hasta las DO indicadas y utilizadas para determinar la cantidad de Hxt6-GFP en extractos crudos mediante inmunodetección o para cuantificar la señal de Hxt6-GFP mediante fluorimetría como se describe en materiales y métodos. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda y la tinción de la membrana con 'direct blue' se utilizó como control de carga. Resultados similares se observaron en dos experimentos independientes.

Hxt6-GFP	0.5	1.0
WT	672	1072
<i>art4</i>	3841	3072
<i>art7</i>	3460	2641
<i>art4 art7</i>	2946	2288

reforzado en el doble mutante. Se cuantificó además la señal de GFP mediante fluorimetría. Los resultados se muestran a continuación.

Como se puede observar en la figura 40, el comportamiento de células crecidas en medio MY 2% rafinosa respecto a la expresión de Hxt6 es similar al de células crecidas en YPRaf. Las principales diferencias se observa en los niveles de transportador, mayores en medio YPRaf, y a su comportamiento a lo largo de las diferentes fases de crecimiento estudiadas. Mientras que en medio YPRaf los niveles de Hxt6 se mantienen poco alterados a lo largo de las diferentes condiciones, en medio mínimo se observa un claro descenso de los mismos dependiente de la fase en la que se encuentra el cultivo. Esto podría ser debido a las diferencias en composición entre ambos medios, siendo independiente de la fuente de carbono utilizada y de su concentración, puesto que en ambos casos se utilizó rafinosa 2%.

En general, estos datos revelan el papel fundamental de Art4 y Art7 en la acumulación de Hxt6 y atribuyen un rol adicional a estas dos proteínas, descritas hasta el momento como adaptadoras de Rsp5 y cuya relevancia fisiológica ha sido relacionada mayoritariamente con el proceso de endocitosis.

2.7. Análisis de los niveles de mRNA de Hxt6 en la cepa silvestre y *art4*.

En el apartado anterior se puede observar como los niveles de Hxt6 de los mutantes *art4* se muestran alterados en las diferentes condiciones de crecimiento ensayadas, mostrando la implicación de Art4 en la acumulación del transportador de alta afinidad Hxt6. Estos datos llevaron al planteamiento de dos posibilidades. La primera, que el incremento de Hxt6 en el mutante *art4* se debiera a un aumento de su estabilidad a nivel postraduccional o por otra parte que esta intensificación se correlacionase con una mayor expresión génica del transportador y por tanto que su origen fuera transcripcional. Con el fin de responder a estas dos cuestiones se utilizó el análisis *Northern blot* para cuantificar los niveles del mRNA de *HXT6* que presentaban las cepas *HXT6-GFP* en los fondos genéticos silvestre y *art4*. Además, se incluyeron estas dos cepas transformadas con el plásmido de sobreexpresión pWS93-*SNF1* por la implicación de esta proteína-quinasa en la regulación a nivel transcripcional de otros genes de la familia HXT como *HXT1* (Tomás-Cobos L, 2002).

Para ello, la cepa silvestre *HXT6-GFP* y *art4 HXT6-GFP* transformadas con el vector pWS930 y pWS93-*SNF1* se crecieron en medio líquido SD con glucosa 2% como fuente de carbono hasta fase logarítmica (DO_{600} 0.5), y las muestras fueron recogidas y procesadas como se describe en el apartado *Northern blot* de materiales y métodos. Al mismo tiempo se recogieron muestras para análisis *Western blot* con la finalidad de comprobar la correcta expresión de las proteínas sometidas a estudio. Como control positivo (C+) se utilizó una cepa silvestre *HXT6-GFP* crecida en medio SD con rafinosa 2% como única fuente de carbono, y como control negativo (C-) una cepa crecida en SD glucosa 2% cuyo gen *HXT6* no había sido etiquetado con la pauta abierta de lectura correspondiente a *GFP*. Para la detección del mensajero se utilizó una sonda GFP y para normalizar los datos una sonda del gen *ACT1*. Los resultados se muestran a continuación.

En la figura 41, se pueden apreciar diferencias entre la cepa silvestre y la cepa mutante *art4*. Mientras que en la primera se observa una muy baja presencia del mensajero de *HXT6* como cabría esperar en células crecidas en medio con glucosa, en la cepa mutante se observan valores de mensajero intermedios entre la cepa silvestre y la cepa control crecida en medio con rafinosa 2% (control positivo). En un análisis más detallado, dentro de la cepa silvestre no se observan diferencias significativas entre la cepa portadora del vector vacío o aquella donde se sobreexpresa *SNF1*. Atendiendo a la cepa mutante *art4*, sí se pueden identificar diferencias entre la presencia o la falta de sobreexpresión de *SNF1*. Aunque en ambas cepas se observan niveles superiores de mensajero respecto a las cepas silvestres, en aquella portadora del plásmido pWS93-*SNF1* se observa además un incremento en la señal del mensajero de *HXT6*. Este resultado podría estar sugiriendo el papel de Snf1 en la regulación de la expresión del gen *HXT6*, rol que ya ha sido descrito en la expresión de genes de otros transportadores de hexosas como *HXT1* (Tomás-Cobos L, 2002). Por otra parte, existen dos posibles interpretaciones para explicar el incremento en los niveles de expresión de *HXT6* en la cepa mutante *art4* que presenta niveles endógenos de Snf1. Que la proteína Art4 tuviese un papel represor en la transcripción del gen cuando las células son crecidas en glucosa, función que no ha sido descrita para ninguno de los integrantes de la familia proteica ART, o que por otra parte la proteína Art4 tuviese una implicación en la toma de

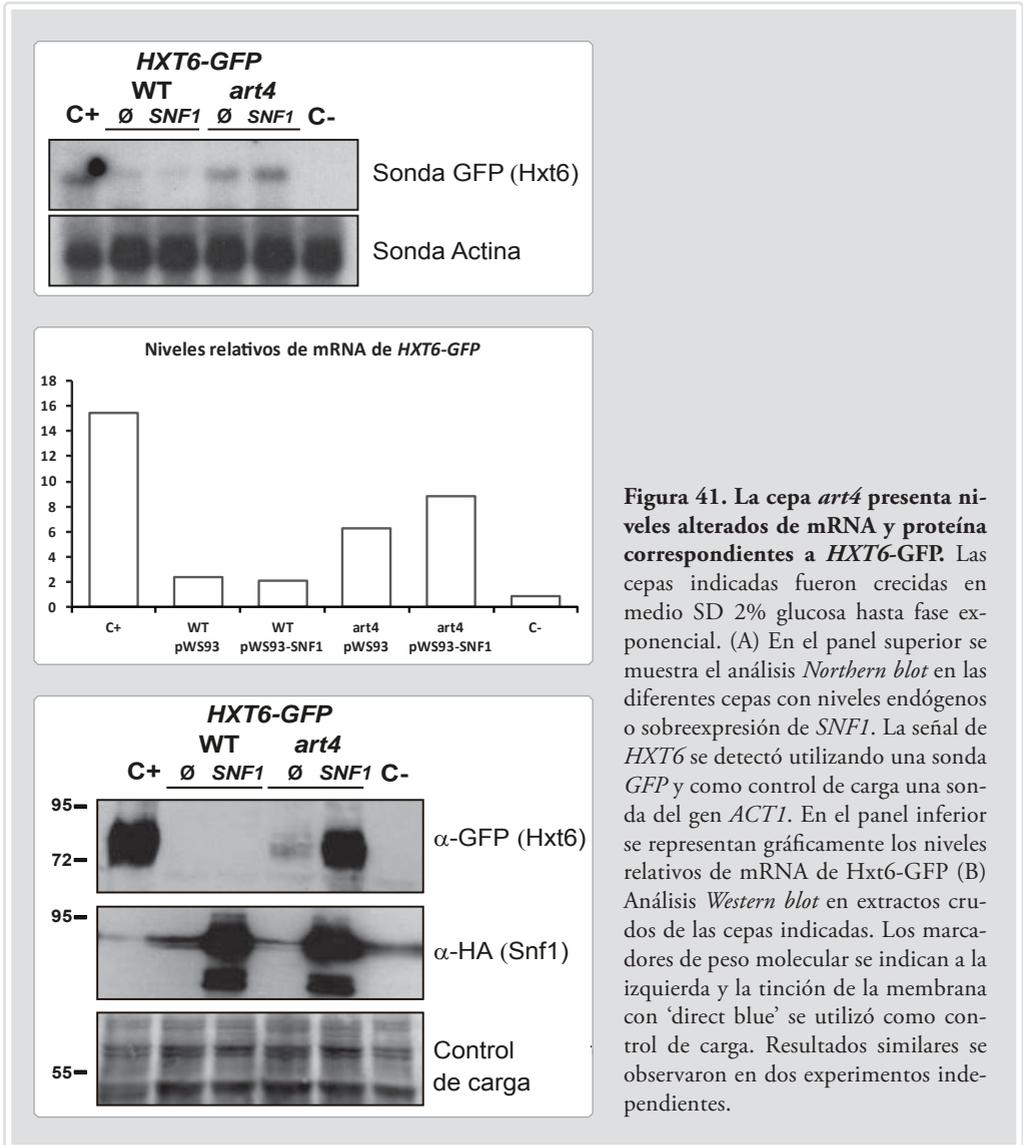


Figura 41. La cepa *art4* presenta niveles alterados de mRNA y proteína correspondientes a *HXT6-GFP*. Las cepas indicadas fueron crecidas en medio SD 2% glucosa hasta fase exponencial. (A) En el panel superior se muestra el análisis *Northern blot* en las diferentes cepas con niveles endógenos o sobreexpresión de *SNF1*. La señal de *HXT6* se detectó utilizando una sonda *GFP* y como control de carga una sonda del gen *ACT1*. En el panel inferior se representan gráficamente los niveles relativos de mRNA de Hxt6-GFP (B) Análisis *Western blot* en extractos crudos de las cepas indicadas. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda y la tinción de la membrana con 'direct blue' se utilizó como control de carga. Resultados similares se observaron en dos experimentos independientes.

glucosa y por tanto, la cepa mutante estuviese percibiendo o experimentando una reducción en la cantidad interna de glucosa. Frente a este estrés, las células responderían con la biosíntesis de transportadores de alta afinidad, respuesta que implicaría una remodelación transcripcional con el consiguiente incremento de los niveles de mRNA del transportador *HXT6*. A pesar de ello, solo la regulación transcripcional parece no poder explicar los niveles proteicos de Hxt6 observados en células que sobreexpresan *SNF1*, por lo que cabe también considerar que la mayor acumulación de Hxt6 se debe a un efecto de Snf1 a nivel postraduccional. En base a nuestros estudios previos, donde se observó la localización incorrecta del complejo Hxt6-Art4, la sobreexpresión de Snf1 junto a la ausencia de Art4 podría estar originando una mayor deslocalización del transportador

que no llevará a cabo de manera adecuada su función fisiológica, situación ante la cual la célula responderá con una mayor biosíntesis del transportador para intentar paliar la carencia de glucosa. Al mismo tiempo, la sobreexpresión de Snf1 dificultará la correcta ubiquitinación del transportador necesaria para su degradación, añadiendo otro nivel de acumulación anómala de Hxt6 que daría como resultado los niveles del transportador observados a nivel de proteína.

2.8. Acumulación de Art4 en respuesta a cambios en la fuente de carbono.

Como se ha podido observar en apartados anteriores, la proteína Art4 juega un papel fundamental en la endocitosis del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 al igual que está implicada en su acumulación, observándose fenotipos de endocitosis y acumulación incorrectos del transportador en cepas mutantes *art4*. Tal como se ha visto, los niveles de Hxt6 responden a cambios en la fuente de carbono utilizada y por consiguiente los niveles de Art4, arrestina implicada en su endocitosis, podrían del mismo modo encontrarse regulados según la fuente de carbono disponible. Para ello, se determinaron los niveles de Art4 en células de la cepa BY4741 transformadas con el vector pNTrp-ART4, y crecidas en medio SD con glucosa o rafinosa 2% suplementado con CuSO4 para la sobreexpresión del gen. Tras alcanzar los cultivos una DO600 0.6, se les cambió la fuente de carbono a glucosa 2% para células crecidas inicialmente en rafinosa y a rafinosa 2% para células crecidas en glucosa. La toma de muestras se realizó a t=0 y tras 45 y 90 minutos después de la adición de la nueva fuente de carbono con el fin de observar la acumulación de Art4 en respuesta a esta variación ambiental. Las muestras fueron procesadas para su análisis *Western blot* y los resultados se muestran a continuación.

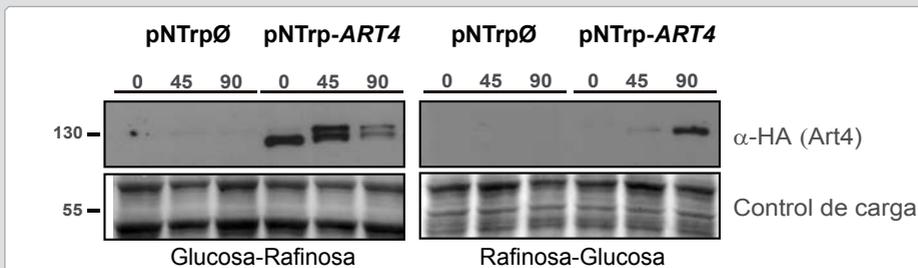


Figura 42. Art4 es fosforilado e incrementa su estabilidad cuando las células son crecidas en glucosa. Las células fueron crecidas en medio SD líquido con CuSO₄ 100 μM hasta una DO₆₀₀ 0.6. En el caso de las células crecidas originariamente en rafinosa, la glucosa fue añadida hasta una concentración final del 2%. En el caso del cultivo crecido en glucosa, las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas una vez con agua y resuspendidas en medio con rafinosa 2%. Las muestras se tomaron en los tiempos indicados (minutos) y procesadas para su análisis mediante *Western blot*.

Como se observa en la figura 42, existe una respuesta de Art4 al cambio en la fuente de carbono, siendo esta proteína más estable cuando la glucosa es la fuente de carbono presente en el medio. Como se puede observar en la cinética glucosa-rafinosa, se produce un “shift” en la banda correspondiente a Art4 debida a la fosforilación de la proteína en respuesta al cambio en la fuente de carbono (Shinoda y Kikuchi, 2007; Becuwe *et al.*, 2012) al mismo tiempo que se produce una disminución los niveles de Art4 claramente observable tras 90 minutos del cambio de fuente de carbono. Por el contrario, en la cinética rafinosa-glucosa se contempla la acumulación de Art4 tras 90 minutos de tratamiento, siendo casi imperceptibles sus niveles más tempranamente. Estos resultados muestran que la acumulación de Art4, al igual que la de Hxt6, depende de la fuente de carbono disponible, aunque su comportamiento es opuesto; mientras Art4 se acumula en presencia de glucosa, los niveles de Hxt6 disminuyen. Esta observación encaja con la dinámica observada en el transportador Hxt6, presente en la membrana en condiciones de baja glucosa y destinado a la ruta endocítica cuando la glucosa no supone un factor limitante. Este comportamiento muy probablemente estará originado por la mayor presencia de Art4 en células crecidas en glucosa, que facilitarán la endocitosis de Hxt6 al permitir a Rsp5 llevar a cabo su ubiquitinación. En el caso de Art7, resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron un comportamiento idéntico al de Art4, observándose también su acumulación en respuesta a glucosa y mostrando una vez más aspectos comunes en la regulación de ambas proteínas.

2.9. Estudio de la toxicidad del análogo de la glucosa, 2-desoxy-glucosa, en mutantes *art4* y *art7*.

Para profundizar en el conocimiento del papel de Art4 no solo a nivel endocítico sino también en la toma de glucosa, se diseñó un experimento para intentar definir si la toma de este azúcar se ve afectada en el mutante *art4*.

Con este fin, se decidió utilizar un análogo tóxico de la glucosa, la 2-desoxy-glucosa (2-DG), para determinar si su transporte al interior de la célula se encuentra afectado en mutantes *art4*. En el ensayo se decidió incluir también la cepa mutante para la proteína Art7 por su estrecha relación con Art4 y como control positivo se incorporó el mutante *hxx2*, proteína quinasa que cataliza la fosforilación de la glucosa en el citoplasma y cuya tolerancia a 2-DG quedó demostrada (Lobo y Maitra, 1977; Heredia y Sols, 1964). Las comprobaciones pertinentes se llevaron a cabo mediante goteos en placas de SCD glucosa 2% suplementadas con 2-DG 0.15%, concentración que previamente se comprobó como óptima para el experimento. Los resultados, después de tres días de incubación a 28°C, se muestran a continuación.

Como se observa en la figura 43, el mutante *art4* muestra cierta tolerancia a 2-DG, tolerancia que sin alcanzar los niveles del mutante *hxx2* se muestra superior a la observada en la cepa silvestre para las condiciones testadas. Este fenotipo sugiere una reducción en la toma del análogo tóxico de la glucosa que podría traducirse como una disminución en la toma general de glucosa. Por otra

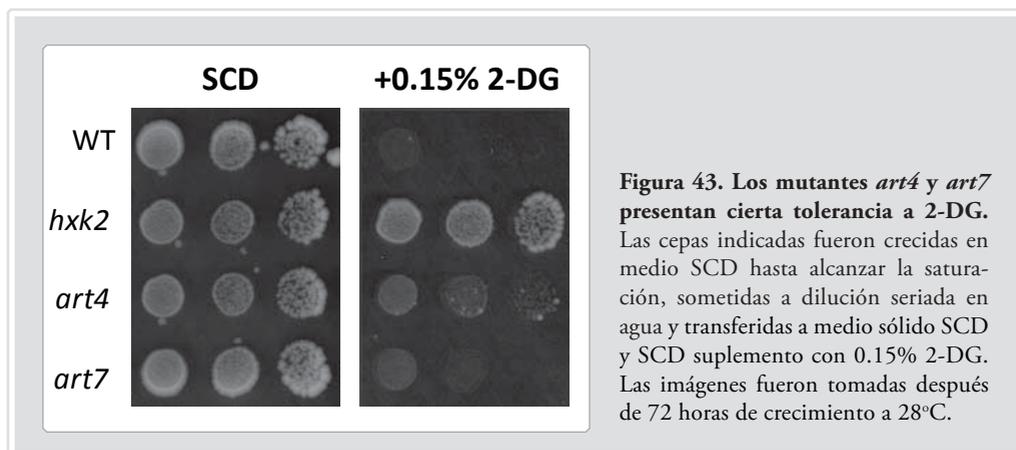


Figura 43. Los mutantes *art4* y *art7* presentan cierta tolerancia a 2-DG. Las cepas indicadas fueron crecidas en medio SCD hasta alcanzar la saturación, sometidas a dilución seriada en agua y transferidas a medio sólido SCD y SCD suplemento con 0.15% 2-DG. Las imágenes fueron tomadas después de 72 horas de crecimiento a 28°C.

parte, el mutante *art7* presenta una leve tolerancia a 2-DG al ser comparado con la cepa silvestre, tolerancia menor que la observada en el mutante *art4* y que apunta a un papel significativamente menos destacado en el origen de este fenotipo.

2.10. Estudio de la implicación de Art4 en la regulación de otros transportadores de la familia HXT.

En un intento de profundizar en el fenotipo de tolerancia a 2-DG observado en el mutante *art4*, se decidió aplicar la misma aproximación experimental a un conjunto de mutantes de la familia HXT para determinar qué transportadores de glucosa podrían estar involucrados en este fenotipo y por tanto tener algún tipo de relación de regulación con la proteína Art4 o Art7. Para ello, las cepas mutantes *hxt1*, *hxt2*, *hxt3*, *hxt4* y *hxt5* así como los mutantes para los sensores de glucosa *rgt2* y *snf3*, y el mutante *hxx2*, utilizado como control positivo, fueron crecidos en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Los fenotipos de crecimiento para las diferentes cepas se muestran a continuación.

Como se observa en la figura 44, tres de los mutantes testados presentan niveles de tolerancia superiores a 2-DG al ser comparados con la cepa silvestre. En primer lugar, mutantes para el transportador Hxt3 y para el sensor Snf3 presentan grados de tolerancia similares para este análogo tóxico de la glucosa. Por otra parte, el mutante para el transportador Hxt1 también presenta cierta tolerancia aunque en menor grado si se compara con los dos mutantes anteriores. Estos resultados podrían estar apuntando a una implicación de Art4, y tal vez Art7, en la regulación de Hxt1, Hxt3 y Snf3, puesto que los análisis fenotípicos de las cepas mutantes comparten la tolerancia a 2-DG como rasgo común.

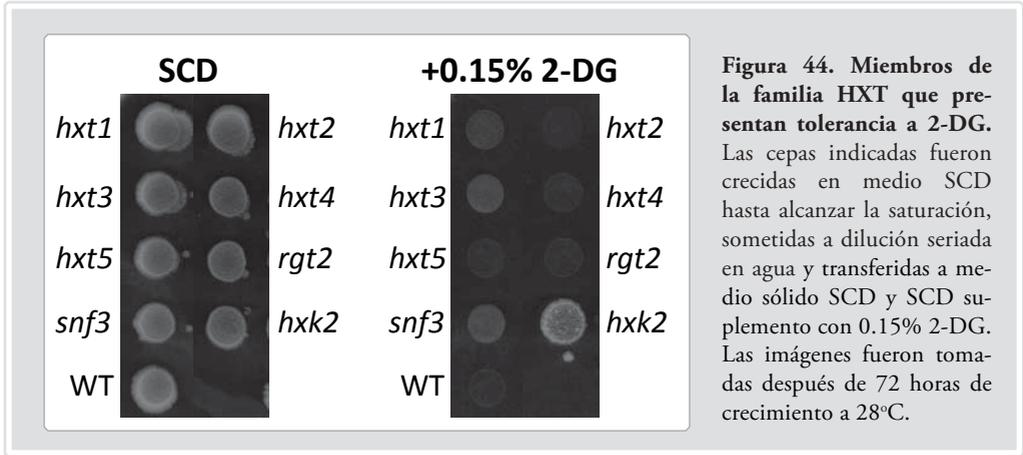


Figura 44. Miembros de la familia HXT que presentan tolerancia a 2-DG. Las cepas indicadas fueron crecidas en medio SCD hasta alcanzar la saturación, sometidas a dilución seriada en agua y transferidas a medio sólido SCD y SCD suplemento con 0.15% 2-DG. Las imágenes fueron tomadas después de 72 horas de crecimiento a 28°C.

2.11. Análisis de la acumulación de Hxt1, Hxt3 y Snf3 en mutantes *art4* y *art7*.

Para comprobar la posible participación de Art4 y Art7 en la regulación de Hxt1, Hxt3 y Snf3, se examinaron los niveles de estas tres proteínas, fusionadas a GFP a nivel genómico, en la cepa silvestre y los mutantes *art4* y *art7* del fondo genético BY4741. Las cepas así generadas se crecieron en medio YPD e YPrAf y se estudió la acumulación de los transportadores y del sensor de glucosa a diferentes densidades ópticas, correspondientes a las fases exponencial temprana, tardía y estacionaria. Las muestras tomadas en cada uno de los puntos fueron procesadas y los extractos crudos de las células fueron sometidos a análisis *Western blot*. Los resultados obtenidos para cada una de las condiciones experimentales se muestran a continuación.

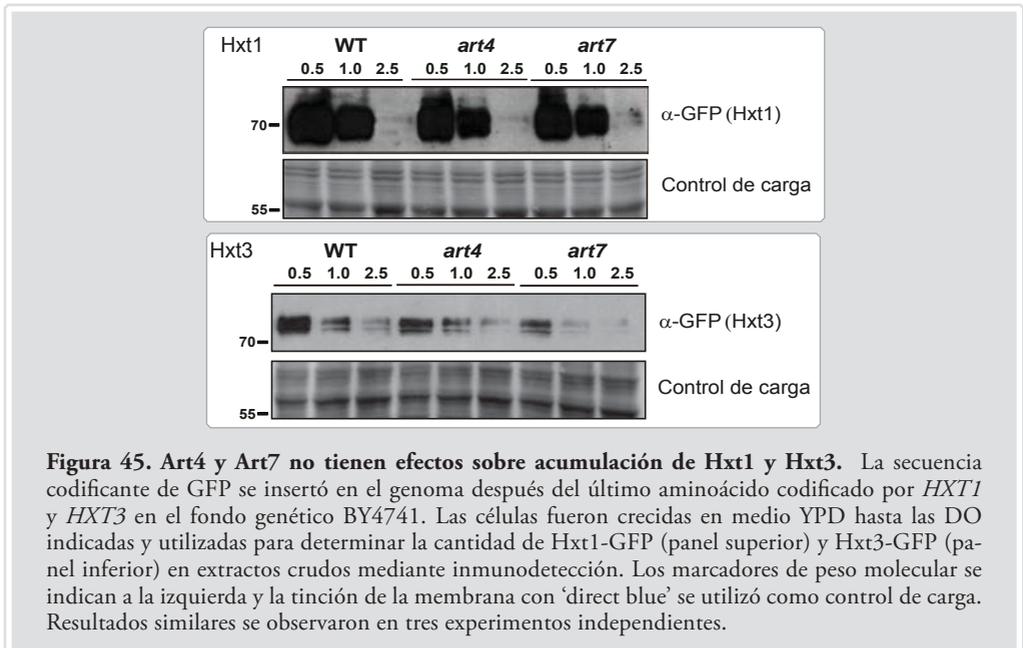


Figura 45. Art4 y Art7 no tienen efectos sobre acumulación de Hxt1 y Hxt3. La secuencia codificante de GFP se insertó en el genoma después del último aminoácido codificado por *HXT1* y *HXT3* en el fondo genético BY4741. Las células fueron crecidas en medio YPD hasta las DO indicadas y utilizadas para determinar la cantidad de Hxt1-GFP (panel superior) y Hxt3-GFP (panel inferior) en extractos crudos mediante inmunodetección. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda y la tinción de la membrana con ‘direct blue’ se utilizó como control de carga. Resultados similares se observaron en tres experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 45, no se observan diferencias significativas en la acumulación de los transportadores Hxt1 y Hxt3 en las diferentes cepas crecidas en medio YPD, reflejando de este modo la no implicación de las dos arrestinas en su acumulación. En células crecidas en medio YPRaf, como cabría esperar, no se detectó señal de Hxt1 o Hxt3 en ninguna de las cepas utilizadas. Del mismo modo, no se detectó señal del sensor Snf3 en ninguna de las dos condiciones de crecimiento (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que Art4 y Art7 no están implicadas en la acumulación de los transportadores Hxt1 y Hxt3, puesto que los niveles observados en ambos mutantes son similares a los niveles de la cepa silvestre, demostrando por tanto que mutaciones en Art4 y Art7 afectan específicamente a la acumulación del transportador de alta afinidad Hxt6



Discusión

1.- Regulación postraduccional de transportadores de iones

La correcta regulación de las proteínas localizadas en la membrana plasmática con capacidad de transporte de iones y nutrientes es crucial para la adecuada adaptación de las células a condiciones ambientales variables. A lo largo de los años ha quedado ampliamente demostrado que la ubiquitinación tiene un papel fundamental en este proceso tanto en levaduras como en plantas y mamíferos (Mulet *et al.*, 2013) y las E3 ubiquitina ligasas pertenecientes a la familia HECT, Rsp5 en levadura y Nedd4-2 en mamíferos, han sido relacionadas con la regulación específica de proteínas transportadoras de membrana.

Nuestros estudios revelan que el transportador de potasio Trk1 es diana de ubiquitinación, haciendo de este modo más factible que la maquinaria de endocitosis esté implicada en su internalización. De ser así, muy probablemente existan proteínas ART que intervengan en su ubiquitinación, haciendo de mediadoras entre el transportador y las E3 ubiquitina ligasas. Se sabe que las quinasas Hal4 y Hal5 están implicadas en la llegada de Trk1 a la vacuola, aunque su interacción física no ha sido demostrada (Pérez-Valle *et al.*, 2007), lo que sugiere que estas quinasas podrían estar regulando la endocitosis de Trk1 de forma indirecta a través de otros componentes de la vía endocítica, pudiendo ser las proteínas de la familia ART las dianas de fosforilación. Además de estas proteínas, la ubiquitinación de Trk1 debe contar con una E3 ubiquitina

ligasa, responsable en última instancia de la reacción de ubiquitinación del transportador. La ubiquitinación de permeasas de la membrana plasmática ha sido ampliamente relacionada con la E3 ubiquitina ligasa Rsp5. Aunque no es posible descartar que en el caso de Trk1 también sea la encargada de la reacción de ubiquitinación, la identificación de Irc20 en nuestro rastreo de doble híbrido plantea una posible alternativa. Se ha descrito la relación entre ubiquitina y el proteasoma (Finley *et al.*, 2012), donde Irc20 aparece dentro del grupo de las E3 ubiquitina ligasas por poseer un dominio RING. Actualmente, la anotación para Irc20 en SGD, además de incluir la función de helicasa putativa que le atribuimos en un principio, incluye también la función de E3 ubiquitina ligasa tras quedar demostrada en la publicación de Richardson *et al.* (2013), aunque más relacionada con la transcripción y reparación del DNA. A la luz de estos nuevos datos, nuestros ensayos podrían ser retomados para comprobar la posible existencia de un fenotipo del mutante *irc20* en contextos diferentes a los ya probados, así como se podrían diseñar nuevas aproximaciones para intentar encontrar las posibles implicaciones de Irc20 en la regulación del transportador de potasio de alta afinidad Trk1.

Como hemos comentado, la homeóstasis de potasio juega un papel fundamental en diversos parámetros fisiológicos, como son el volumen celular, la activación de enzimas, el pH intracelular o el potencial de membrana. Reflejo de ello es la influencia de este ión en la modulación de la actividad de otras permeasas de la membrana plasmática como la bomba de protones Pma1. Nuestros datos reflejan la rápida activación de Pma1 en respuesta a ayuno de potasio tal y cómo predijo el modelo matemático (Kahm *et al.*, 2012), mostrando la coordinación existente en las células para mantener niveles adecuados de potasio intracelular. La respuesta de las células expuestas a ayuno de potasio implica tanto la activación de Pma1, para generar flujos de protones hacia el exterior celular, como el desplazamiento de reacciones intracelulares hacia la producción de anión bicarbonato y protones a partir de ácido carbónico. Ambos mecanismos tienen una misma consecuencia; la hiperpolarización de la membrana plasmática. La finalidad de este mecanismo es intentar compensar la hiperpolarización de la membrana con iones K^+ , que al poseer carga positiva serán atraídos y retenidos con mayor facilidad en células en las que el citoplasma presenta mayor carga negativa, ayudando a restablecer el balance de cargas y poniendo de manifiesto la importancia del potasio a nivel fisiológico. Estos resultados muestran, una vez más, la complejidad de las redes encargadas del mantenimiento de la homeostasis de iones para el mantenimiento de las funciones celulares.

2.- Caracterización bioquímica de la ruta de señalización Snf1 - Art4 - 14-3-3

Hemos descrito ampliamente como la ubiquitinación participa en la endocitosis y en la clasificación de transportadores hacia los orgánulos implicados en procesos de degradación (Revisado en MacGurn *et al.*, 2012). En este sentido, la E3 ubiquitina ligasa de levadura, Rsp5, ha sido implicada en la regulación de un gran número de transportadores de membrana (revisado en Lauwers *et al.*, 2010). El reconocimiento de esta amplia variedad de transportadores por una única ubiquitina ligasa hace necesaria la utilización de proteínas adaptadoras que aporten especificidad a la interacción, entre las cuales se encuentra la familia ART. La mayoría de estas proteínas contienen tanto motivos (L/P)PXY, que interaccionan con los motivos WW de Rsp5, como motivos tipo arrestina, que han sido propuestos como los encargados del reconocimiento de los diferentes transportadores. Como hemos visto a lo largo de este trabajo, las modificaciones postraduccionales de estas proteínas adaptadoras suman un nivel más de regulación en la respuesta a cambios ambientales. Ejemplos de ello son la regulación de la actividad de Art1 a través de la quinasa Npr1 (MacGurn *et al.*, 2011) o la implicación de la quinasa Snf1 en la regulación de Art4 en respuesta a cambios de fuente de carbono (Becuwe *et al.*, 2012; Shinoda y Kikuchi, 2007).

Basándonos en los resultados previos que demostraban como la proteína quinasa Snf1 participaba en la fosforilación de Art4 (Shinoda y Kikuchi, 2007), en el presente estudio, con los resultados obtenidos mediante ensayos de doble híbrido, hemos demostrado la existencia de una interacción física entre Art4 y Snf1. Además, demostramos que Art7 aparece como un nuevo miembro de la familia ART en cuya regulación interviene Snf1, sugiriendo que ambas proteínas adaptadoras podrían estar reguladas de manera similar al mismo tiempo que podrían estar implicadas en las mismas rutas de señalización dada su alta homología de secuencia, tal y como fue descrito para otros adaptadores como Bul1 y Bul2, implicados en la regulación del transportador de aminoácidos Gap1 y cuya fosforilación es Npr1-dependiente (Merhi y André, 2012).

Para profundizar en el estudio de la interacción física entre Art4 y Snf1, se procedió al mapeo de la interacción física entre ambas proteínas con la finalidad de identificar cuáles son los motivos o dominios implicados en el establecimiento de dicha interacción. Nuestros resultados muestran como los dominios involucrados son la mitad N-terminal de Art4, que contiene el dominio tipo arrestina característico de esta familia de proteínas, y el dominio regulador de Snf1, permitiendo al dominio quinasa llevar a cabo las fosforilaciones oportunas de residuos de serina en la proteína diana.

Estudios precedentes han descrito a las proteínas 14-3-3 como interactoras de las proteínas adaptadoras de Rsp5. Ejemplo de ello son las interacciones establecidas entre Art4 y Bul1/Bul2 con la proteína Bmh2 (Becuwe *et al.* 2012; Merhi y André, 2012). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran como, dentro de la familia ART, la interacción con las proteínas 14-3-3 no es exclusiva de Art4 sino que todas las proteínas que la integran, a excepción de Art3 y Art5, interaccionan físicamente con la isoforma de levadura Bmh2. Este fenómeno sugiere un papel generalizado para las proteínas 14-3-3 en la regulación de los transportadores de membrana en cuya endocitosis participa la E3 ubiquitina ligasa Rsp5, actuando como un interruptor en la

función de las α -arrestinas. Futuros estudios deberán definir las condiciones específicas en las que las interacciones observadas tienen relevancia fisiológica y cuáles son los estímulos que favorecen o impiden la interacción entre las diferentes proteínas adaptadoras y las proteínas 14-3-3. Otros ejemplos en la literatura demuestran que la relación entre E3 ubiquitina ligasas y proteínas 14-3-3 no es un fenómeno exclusivo de levadura, ya que una isoforma de estas proteínas fue relacionada con la regulación de la E3 ubiquitina ligasa de mamíferos Nedd4-2 (Bhalla *et al.*, 2005; Ichimura *et al.*, 2005), aunque a través de una interacción directa entre ambas proteínas sin necesidad de proteínas adaptadoras.

Nuestros resultados confirman la existencia de una interacción entre Art4 y Snf1 al igual que la interacción entre Art4 y Bmh2. Una de las características que definen a las proteínas 14-3-3 es su afinidad de unión a sustratos fosforilados (revisado en van Heusden, 2009), aspecto que sugeriría la posibilidad de que en la interacción entre Art4 y Bmh2, la quinasa Snf1 jugara un papel importante. Nuestros ensayos de doble híbrido entre Art4 y Bmh2, en los que además se sobreexpresa la proteína Snf1, su versión hiperactiva (Snf1 G53R) o su versión catalíticamente inactiva (Snf1 K84R), demuestran que efectivamente la quinasa Snf1 interviene en la interacción de ambas proteínas dadas las diferencias de crecimiento observadas entre las cepas que sobreexpresan las diferentes versiones de Snf1, resultados que además vienen respaldados por los correspondientes ensayos cuantitativos que nos han permitido estimar la intensidad de la interacción.

Estudios anteriores demostraron que la quinasa Snf1 era la responsable de la fosforilación de la serina 447 de la proteína adaptadora Art4 (Shinoda y Kikuchi, 2007). A raíz de estos datos, se incorporaron a los experimentos de interacción proteína-proteína entre Bmh2 y Art4 las versiones de Art4 con mutaciones puntuales en la serina 447 con la finalidad de revelar su implicación en esta interacción. Nuestros resultados, respaldados por un estudio reciente (O'Donnell *et al.*, 2015), muestran como en la cuantificación de esta interacción no aparecen diferencias significativas entre la versión silvestre de Art4 y la versión portadora de la mutación, indicando que la serina 447 no está implicada en la interacción Art4-Bmh2 o que intervienen otros residuos de serina que son suficientes para que la interacción se siga produciendo. A favor de esta última hipótesis encontramos un ejemplo en la bibliografía donde se describe que la mutación de un solo sitio de fosforilación dependiente de la quinasa Npr1 en el extremo N-terminal de Art1, donde se encuentran hasta cuatro residuos diana de fosforilación, no tiene efectos en su función, pero que por el contrario la sustitución de varios residuos de serina por residuos de alanina tienen un claro efecto sobre la función de esta proteína adaptadora, cuya fosforilación parece estar implicada en la inhibición de su función (MacGurn *et al.*, 2011). A pesar de que no se ha descrito que en la regulación de Art1 intervengan proteínas 14-3-3, nuestros datos sugieren la posibilidad de que, al igual que ocurre con Art4 y Snf1, la fosforilación de Art1 a través de Npr1 genere sitios de unión para proteínas 14-3-3.

En resumen, nuestros datos confirman la interacción entre Art4 y Snf1 y sitúan a Art7 como una diana adicional en cuya fosforilación podría estar implicada la quinasa Snf1. Establecen que la interacción Art4-Snf1 se produce entre la mitad N-terminal de Art4 y el dominio regulador de

Snf1 y que la fosforilación de Art4 llevada a cabo por Snf1 es importante para el establecimiento de la interacción con proteínas 14-3-3, proteínas que interaccionan con Art4 a través de su extremo N-terminal, y cuya capacidad de interacción no parece limitarse a Art4 sino que por el contrario puede extrapolarse a la mayoría de las proteínas que componen la familia ART. Con los resultados presentados, el modelo de interacción entre Art4-Snf1-14-3-3 propuesto se muestra en la figura 46.

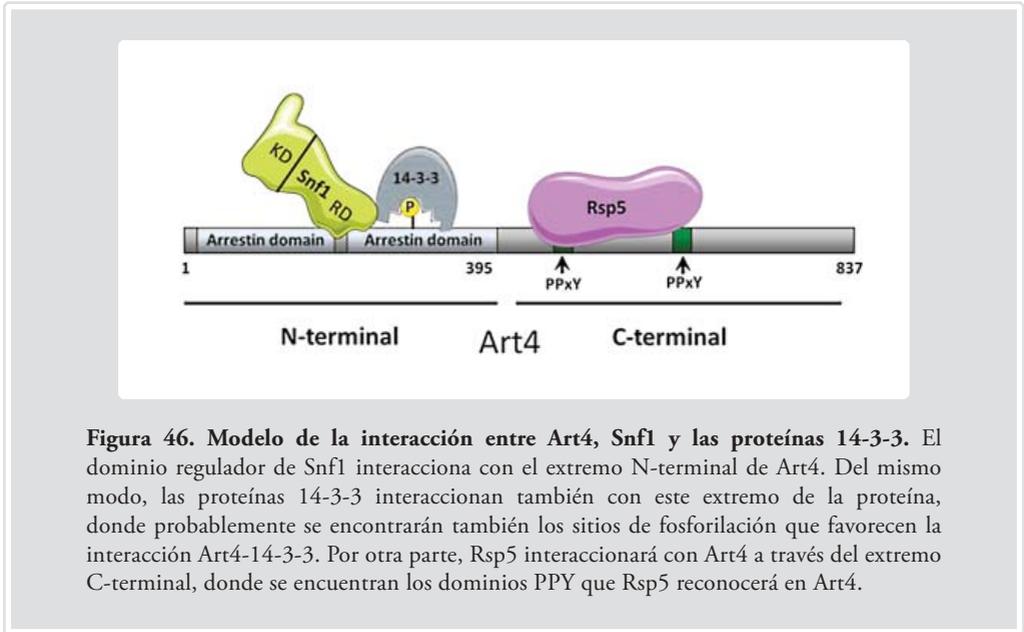


Figura 46. Modelo de la interacción entre Art4, Snf1 y las proteínas 14-3-3. El dominio regulador de Snf1 interacciona con el extremo N-terminal de Art4. Del mismo modo, las proteínas 14-3-3 interaccionan también con este extremo de la proteína, donde probablemente se encontrarán también los sitios de fosforilación que favorecen la interacción Art4-14-3-3. Por otra parte, Rsp5 interaccionará con Art4 a través del extremo C-terminal, donde se encuentran los dominios PPY que Rsp5 reconocerá en Art4.

3.- Papel del complejo Snf1 - Art4 - 14-3-3 en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6

La endocitosis de transportadores de membrana en levadura ha sido descrita durante años como un fenómeno desencadenado por cambios en el entorno, especialmente en el caso de los transportadores de diferentes fuentes de carbono (revisado en Horák, 2003). Algunos de los componentes de las rutas de señalización implicadas en la regulación por endocitosis de permeasas de fuentes de carbono han sido reseñados (Jiang *et al.*, 2000; Horak *et al.*, 2002; Mayordomo *et al.*, 2003), aunque los detalles de cómo esta regulación tenía lugar a nivel molecular seguían sin estar descritos en profundidad. En esta línea, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la implicación de la ruta de señalización Art4-Snf1-14-3-3 en el tráfico del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6, aportando nuevas evidencias sobre su regulación y resolviendo algunas incógnitas que habían quedado sin determinar en el estudio de la endocitosis del transportador de lactato Jen1 (Becuwe *et al.* 2012).

Algunos estudios demuestran la existencia de interacciones físicas entre proteínas adaptadoras y las proteínas de membrana a las que regulan (Alvaro *et al.*, 2014; Hatakeyama *et al.*, 2010; Nikko *et al.*, 2008). De manera similar, nuestro estudio confirma la interacción física entre Hxt6 y Art4 mediante dos aproximaciones diferentes, co-inmunoprecipitación y BiFC, y aporta nuevas evidencias acerca de la localización subcelular en la que dicha interacción se establece. En el ensayo de co-inmunoprecipitación se muestra como tras la adición de glucosa a células crecidas en medio con rafinosa como fuente de carbono se produce la co-inmunoprecipitación de Hxt6 y Art4. Este fenómeno revela que se produce una interacción física entre Hxt6 y Art4 en respuesta a la adición de glucosa, condición en la que la función del transportador de alta afinidad no resulta imprescindible y por lo tanto se procederá a su ubiquitinación a través de proteínas adaptadoras y E3 ubiquitina ligasas para su posterior degradación.

Mediante el empleo de la técnica BiFC, la visualización *in vivo* de la interacción física entre Art4-Hxt6 nos permite además mostrar la localización del complejo. Mediante su utilización demostramos que la localización subcelular de esta interacción se produce a nivel de membrana plasmática y que tras la adición de glucosa, se produce un incremento en la cantidad de complejo Art4-Hxt6, hecho que apoya los modelos propuestos donde se sugería que las proteínas adaptadoras reclutarían a Rsp5 en la membrana plasmática para llevar a cabo la ubiquitinación de las proteínas diana de endocitosis, a pesar de que en ningún caso había quedado demostrada la localización en la que tenía lugar el establecimiento de dicha interacción (Lin *et al.*, 2008; Herrador *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2010; Becuwe *et al.*, 2012).

Además de en la membrana plasmática, nuestros datos reflejan el establecimiento de la interacción Art4-Hxt6 también en el interior de la célula, donde se observó señal de BiFC en compartimentos que podrían corresponderse con el retículo endoplásmico, vacuola o con estructuras pertenecientes a endosomas o la red trans-Golgi. Este fenómeno podría estar indicando que, además de su papel en endocitosis, las proteínas ART estarían también implicadas en la llegada de proteínas a la membrana plasmática, facilitando la ubiquitinación de las mismas en diferentes compartimentos

celulares. Ello supondría la señal que la maquinaria implicada en el tráfico de proteínas interpretaría para distribuir entre los diferentes orgánulos las proteínas necesarias en respuesta a diferentes condiciones ambientales. En estudios precedentes se aludió a la localización de Art1, Art6 o Art3 en estructuras internas que podrían formar parte de endosomas/red trans-Golgi (Lin *et al.*, 2008; O'Donell *et al.*, 2010) aunque en ningún caso se hace referencia al establecimiento de la interacción entre la α -arrestina y el transportador al que regulan. En el caso del transportador de aminoácidos Gap1 se describió que diferentes patrones de ubiquitinación, que implican a Rsp5 y en ocasiones a los adaptadores Bul1/2, dirigen el tráfico de esta proteína actuando a nivel de membrana plasmática o de aparato de Golgi, planteando que la maquinaria responsable de la clasificación de Gap1 en la ruta de endocitosis o exocitosis interpretaría diferentes patrones de ubiquitinación en Gap1 (Risinger y Kaiser, 2008). A pesar de las posibilidades existentes, estudios más recientes en nuestro laboratorio muestran claros indicios de que una parte de la interacción observada entre Hxt6 y Art4 en compartimentos intracelulares corresponde con la vacuola (A. Ferri y L. Yenush, datos no publicados). Estos datos demuestran que el complejo BiFC que se forma entre Art4 y Hxt6 viaja a la vacuola por la ruta endocítica, aunque queda por estudiar si las proteínas no modificadas siguen este mismo camino. Por otro lado, queda por demostrar si la señal restante corresponde a la formación del complejo Art4-Hxt6 en otros compartimentos para poder validar la hipótesis de que la interacción Hxt6-Art4 no se produce únicamente en la membrana plasmática y que por tanto puede tener papeles adicionales en el tráfico intracelular de Hxt6.

La apreciación de la señal de BiFC en el interior de la célula se observa sobretodo en cepas transformadas con plásmidos que conllevan la sobreexpresión de Snf1 y Bmh2. Estas cepas muestran una menor presencia del complejo Art4-Hxt6 en la membrana plasmática, lo que lleva a plantear que tanto Snf1 como Bmh2 no impiden la interacción Art4-Hxt6 pero si afectan a su localización subcelular. Observaciones anteriores mostraban como del estado de fosforilación de Art4 depende su estado de ubiquitinación y como estas modificaciones modulan su actividad. La fosforilación de Art4 por Snf1 impide su ubiquitinación, y esta se producirá cuando la fosfatasa PP1, en respuesta a glucosa, desfosforile a Art4 (Becuwe *et al.*, 2014). La sobreexpresión de Snf1 en la cepa BiFCde Hxt6-Art4, por lo tanto, podría estar originando unos niveles anómalos de fosforilación en Art4 que comprometerían su correcta ubiquitinación y por tanto su correcto funcionamiento, razón a la que se debería la observación de un cambio de localización subcelular del complejo Art4-Hxt6. El desequilibrio fosforilación/ubiquitinación mantendría retenidos a ambos en compartimentos intracelulares dificultando su llegada a la membrana, explicando también la co-inmunoprecipitación de Hxt6 y Art4 en células que sobreexpresan Snf1 y son crecidas en medio con rafinosa como fuente de carbono, que representaría a la fracción del complejo Art4-Hxt6 que quedaría retenido en compartimentos intracelulares por un conflicto con su estado de ubiquitinación.

Del mismo modo que sucede con Snf1, la expresión de proteínas 14-3-3 por encima de los niveles endógenos parece tener también un efecto sobre la localización del complejo Art4-Hxt6, cuya base molecular podría no diferir en gran parte de aquella dada para Snf1 y resultados similares en ambos casos lo respaldan. La interacción entre Art4 y las proteínas 14-3-3 coordinan su estado

de ubiquitinación en respuesta a glucosa (Becuwe *et al.*, 2012) y por tanto, niveles elevados de Bmh2 pueden suponer defectos en los patrones de ubiquitinación de Art4, deslocalizando de nuevo el complejo Art4-Hxt6 con unos efectos similares a los obtenidos con Snf1. El que no haya un incremento significativo de interacción o señal de BiFC en la membrana tras la adición de glucosa en células que sobreexpresan Snf1 y Bmh2 podría ser producto de esta deslocalización. La llegada a la membrana sí se produce porque se observa señal BiFC Hxt6-Art4 en la membrana de cepas que expresan Snf1 y Bmh2, aunque el porcentaje de fluorescencia en la membrana respecto a la fluorescencia total de la célula es menor que en el caso de la cepa silvestre debido a que parte del *pool* del complejo Hxt6-Art4 no alcanza la superficie celular, quedando retenido en compartimentos intracelulares.

El cambio de localización observado también puede explicar en parte el retraso en el tiempo de degradación de Hxt6 que se produce en respuesta a la adición de glucosa a células crecidas en medio con rafinosa, donde la sobreexpresión de Snf1 y Bmh2 retarda la degradación del transportador. Este fenómeno, además de estar originado por el efecto de Snf1 y Bmh2 sobre la ubiquitinación de Hxt6 en la membrana, puede deberse a que destinar el transportador a la vacuola desde compartimentos intracelulares, muy probablemente implique cambios en los patrones de ubiquitinación, cambios que se verán dificultados por la sobreexpresión de Snf1 y Bmh2 que, como resultado, prolongarán el tiempo de degradación.

4.- Implicación de Art4 y Art7 en la regulación de transportadores de la familia HXT

Nuestros resultados revelan que, además de Art4, Art7 también está implicada en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6. En primer lugar, el experimento de endocitosis del transportador en respuesta a la adición de glucosa a células crecidas en rafinosa, revela la existencia de una interacción genética entre Hxt6 y Art7, del mismo modo que fue observada en el caso de Art4 (Nikko y Pelham, 2009). La señal de GFP que corresponde a Hxt6 permanece en la membrana no solo en el mutante *art4* sino también en el *art7*, del mismo modo que ocurre, por razones evidentes, en el doble mutante *art4 art7* (Figura 38). La similitud de secuencia entre ambas proteínas, alrededor del 40% (Nikko y Pelham, 2009; MacGurn *et al.*, 2011), concuerda con su implicación en el que aparenta ser el mismo mecanismo, aunque sin ser redundantes puesto que ambos mutantes por separado desencadenan un mismo fenómeno. Recientemente se han descrito otros ejemplos donde Art4 y Art7 han sido implicados en la regulación de una misma proteína de membrana, como es el caso de Ste2, un receptor de feromonas acoplado a proteínas G en cuya internalización participan Art1, Art4 y Art7 (Alvaro *et al.*, 2014), o de miembros de la familia Hxt, como Hxt1 y Hxt3, cuya regulación por endocitosis implica tanto a Art4 como a Art7 (O'Donnell *et al.*, 2014). El hecho de que en la endocitosis de Hxt1 y Hxt3 estén implicadas ambas arrestinas, más las evidencias mostradas a lo largo de este estudio donde la endocitosis del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 conlleva también regulación a través de Art4 y Art7, invita a reflexionar acerca de la implicación de Art4 y Art7 en la regulación de la familia HXT, o de un modo más general, de su implicación en la respuesta a cambios en fuentes de carbono, puesto que la endocitosis del transportador de lactato Jen1 también implica a la proteína adaptadora Art4 (Becuwe *et al.*, 2012).

A partir de estos datos, se quiso poner en conocimiento la relevancia fisiológica tanto de Art4 como de Art7 y con este fin se diseñaron ensayos para determinar la acumulación de Hxt6, fusionado a GFP en el genoma, en la cepa silvestre, *art4* y *art7*. Para ello se crecieron las diferentes cepas en medio YPD e YPRaf hasta diferentes estadios de crecimiento, como son la fase logarítmica temprana, tardía y la fase estacionaria. Las células en estas tres etapas fueron analizadas mediante *Western blot* y citometría de flujo para cuantificar la acumulación del transportador en respuesta a la falta de fuente carbono y nutrientes. Como muestra la figura 39, se observó un ligero incremento progresivo en la acumulación de Hxt6-GFP en células de la cepa silvestre crecidas en YPRaf, fenómeno que no se observa en esta misma cepa crecida en YPD debido a la suficiente disponibilidad de glucosa en las fases de crecimiento analizadas. Sin embargo, los mutantes *art4* y *art7* presentan, a diferencia de la cepa silvestre, niveles detectables de Hxt6-GFP durante la fase estacionaria cuando son crecidos en YPD y una acumulación de transportador anómala cuando son crecidos en YPRaf durante todas las fases del crecimiento y a niveles muy superiores a los observados para la cepa silvestre. Estos resultados muestran a Art4 y Art7 como reguladores negativos de la acumulación de Hxt6 no solo durante el proceso de endocitosis desencadenado por la adición de glucosa a células crecidas en rafinosa, sino también en condiciones de baja glucosa, tanto durante la fase estacionaria de células crecidas en glucosa como a lo largo de todo el ciclo de crecimiento en células crecidas en cantidades limitantes de glucosa. A diferencia del

análisis realizado sobre el receptor de feromonas Ste2, donde es necesaria la delección tanto de *ART4* como de *ART7* para observar un fenotipo de hipersensibilidad a feromonas (Alvaro *et al.*, 2014), en el caso del transportador Hxt6 la simple delección de uno de los dos genes es suficiente para originar el fenotipo de acumulación atípica de la proteína. Al mismo tiempo, el doble mutante *art4 art7* no presenta un fenotipo aditivo respecto a los mutantes simples en lo que respecta a su acumulación, por lo que cabe destacar que la relevancia fisiológica de Art4 y Art7 puede variar dependiendo de la proteína de membrana a la que regulen, ya que en el caso de Ste2 ambos parálogos tienen funciones parcialmente redundantes (Alvaro *et al.*, 2014) mientras que en el caso de Hxt6, y en las condiciones analizadas a lo largo de este estudio, tanto los mutantes simples como el doble mutante presentan un mismo fenotipo. Esto sugiere que tanto Art4 como Art7 son necesarios para la correcta internalización de Hxt6, quizás formando parte de un mismo complejo.

Diferentes mecanismos podrían explicar los niveles anormales de Hxt6 observados en los mutantes *art4* y *art7*, ya que su mayor acumulación podría ser la consecuencia de una mayor tasa transcripcional o, por el contrario, de una mayor estabilidad a nivel postraduccional. Con el fin de descartar o corroborar algunos de estos mecanismos, se llevó a cabo un ensayo *Northern blot* para comprobar los niveles de RNA mensajero correspondientes a *HXT6* en la cepa silvestre y en la cepa mutante *art4*. A pesar de que las células fueron crecidas en glucosa 2%, condición en la que la cepa silvestre presenta niveles muy bajos del mensajero de *HXT6*, en el mutante *art4* se observan niveles atípicos del mensajero, que además se ven ligeramente incrementados con la sobreexpresión de Snf1. Los resultados obtenidos en las mismas condiciones pero con el procesamiento de muestras para evaluar los niveles de proteína mediante *Western blot*, no hacen más que apoyar los datos transcripcionales, donde efectivamente se observa una acumulación de Hxt6 en mutantes *art4* que no se aprecia en la cepa silvestre. Los niveles de proteína están incrementados con la sobreexpresión de Snf1, aunque en este caso no están explicados en su totalidad por los cambios contemplados a nivel transcripcional, por lo que muy probablemente existirá también un componente importante de regulación postraduccional. De este ensayo se puede extraer, en primer lugar, que los elevados niveles de Hxt6 observados en el mutante *art4*, dato quizás también extrapolable al mutante *art7* por los fenotipos observados a lo largo de este estudio, tienen un origen transcripcional y muy probablemente también postraduccional, donde la quinasa Snf1 jugará un papel relevante. Por lo tanto, cabría preguntarse acerca del origen de los elevados niveles de mensajero de *HXT6* encontrados en el mutante *art4* aún cuando las condiciones externas no lo requieran. En primer lugar, una hipótesis sugerente es aquella que implicaría a Art4 en el correcto funcionamiento o la correcta inserción de los transportadores de la familia Hxt en la membrana plasmática, hecho que generaría deficiencias en el transporte de glucosa al interior de la célula y que se traduciría en la percepción de un ayuno de glucosa temprano, fenómeno que explicaría que las células de la cepa silvestre continúen sin acumular Hxt6 en el momento en el que tanto el mutante *art4* como *art7* ya presentan niveles detectables. Esta hipótesis estaría en concordancia con los datos obtenidos a partir de la expresión génica de *HXT6* en el mutante *art4*, donde la respuesta de la célula sería la de activar la transcripción del transportador de glucosa de alta afinidad como respuesta a la infundada escasez de glucosa.

De manera alternativa, otra hipótesis que describiría parcialmente los fenotipos observados es aquella que incluiría una transcripción basal de *HXT6*, como se podría desprender de nuestros resultados en la detección del mensajero de *HXT6* al comparar los niveles de mensajero en la cepa silvestre respecto al control negativo (Figura 41). Estos niveles transcripcionales basales originarían un recambio constante de Hxt6 hacia y desde la membrana plasmática, recambio que supondría la endocitosis constitutiva de Hxt6 mientras las condiciones externas no requieran lo contrario. Si asumimos que en este recambio desde la membrana hacia compartimentos intracelulares a través del proceso de endocitosis participa Art4, la ausencia de esta α -arrestina originaría la acumulación de Hxt6 en la membrana debido a la incapacidad de internalizar y degradar el transportador. A pesar de no resolver la parte transcripcional, este fenómeno explicaría la anormal acumulación de Hxt6 observada en los mutantes *art4* y *art7*, además de no entrar en contradicción con la anterior hipótesis expuesta. Es más, la fusión de ambas posibilidades serviría para explicar los niveles totalmente alterados de Hxt6 observados en células crecidas en medio con rafinosa como fuente de carbono, donde la acumulación de Hxt6 se produciría debido a la constante percepción de falta de glucosa por el incorrecto funcionamiento de Hxt6, que se traduciría en una síntesis casi constitutiva del transportador sumada a la incapacidad de la célula para internalizar y degradar el exceso de transportador por carecer de las proteínas ART necesarias para ello.

Además de estas observaciones, también se ha podido contemplar que la sobreexpresión de Snf1 en el mutante *art4* eleva los niveles de transcrito de *HXT6* en células crecidas en medio con glucosa, efecto que se ve reflejado efectivamente a nivel de proteína aunque los niveles de Hxt6 observados podrían no estar explicados totalmente a nivel transcripcional. A esta escala lo que podría estar ocurriendo, siguiendo las hipótesis anteriores, es que al percibir un ayuno de glucosa temprano, el mutante *art4* activaría la respuesta a escasez de glucosa de forma anticipada, y de entre los fenómenos que se producen se encuentra la activación de Snf1, que al encontrarse sobreexpresada incrementaría la fosforilación de Mig1, que dejaría de actuar como represor de *HXT6* al ser translocado del núcleo al citoplasma (revisado en Horák, 2013). Este supuesto podría explicar el incremento en los niveles de mensajero de *HXT6* en mutantes *art4* que sobreexpresan Snf1, sin embargo, debido a la complejidad e interrelación que existe entre las rutas de regulación transcripcional de transportadores de hexosas, es complicado establecer la naturaleza de esta respuesta. Por otra parte, la acumulación de Hxt6 en células que sobreexpresan Snf1 crecidas en medio con glucosa como fuente de carbono, casi comparable a la que se produce en medio con rafinosa, puede explicarse en parte debido a la mayor expresión de *HXT6* observada en las condiciones estudiadas, aunque los niveles de proteína contemplados parecen no corresponderse del todo con el aumento a nivel transcripcional, por lo que la acumulación de Hxt6 se podría deber a la misma razón planteada anteriormente; la ausencia de Art4 impediría la endocitosis de Hxt6, que junto al incremento a nivel transcripcional de *HXT6* por la sobreexpresión de Snf1 origina los niveles de proteína observados. Otros fenómenos postraduccionales podrían estar ocurriendo, aunque como se ha dicho con anterioridad, la compleja regulación a la que se encuentran sometidos los genes y proteínas implicadas en el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, no permiten establecer posibles mecanismos de regulación a partir de los datos de los que se disponen.

Hemos mencionado que se ha demostrado que tanto Art4 como Art7, además de Art1, participan en la endocitosis de proteínas de membrana, en este caso del receptor de feromonas Ste2 (Alvaro *et al.*, 2014). En el citado estudio, además de demostrar la implicación de estas tres α -arrestinas en la internalización del receptor, se observó un fenotipo similar al observado en el presente estudio a pesar de sus diferencias fundamentales; una mayor abundancia de Ste2 en los mutantes *art1*, *art4 art7* y el triple mutante *art1 art4 art7*, aunque en este caso los diferentes mutantes parecen tener efectos aditivos mientras que nuestras observaciones no confirman que suceda lo mismo en el caso de Hxt6, donde la cantidad de transportador observada en el doble mutante *art4 art7* es equivalente a los niveles de los mutantes simples *art4* y *art7*. Nuestros resultados muestran que en la mayor abundancia de Hxt6 observada en el mutante *art4*, y probablemente también en el caso de *art7*, existe una componente transcripcional, hecho que no se aborda en el caso de Ste2 y que por tanto no podemos extender a su regulación, aunque sería interesante realizar los experimentos pertinentes para comprobar la existencia o no de un mecanismo o respuesta común en la regulación de proteínas de membrana que implicaría a las α -arrestinas y las relacionaría con las respuestas transcripcionales, aunque muy probablemente de forma indirecta.

Como hemos mencionado con anterioridad, la posibilidad de que la atípica acumulación de Hxt6 en los mutantes *art4* y *art7* se deba a la percepción por parte de la célula de un ayuno de glucosa temprano, se postuló que el transporte de glucosa podría estar viéndose afectado en ambos mutantes, cepas que no transportarían adecuadamente glucosa desde el exterior al interior celular, inactivándose de forma prematura la represión por glucosa y por tanto activándose la biosíntesis de la maquinaria necesaria para la respuesta a la escasez de la fuente de carbono preferida, entre la que se encontraría el transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6. Una manera de comprobar la posible deficiencia en el transporte de glucosa, fue someter a los mutantes *art4* y *art7* a un ensayo de crecimiento frente a la cepa silvestre en presencia del análogo tóxico de la glucosa 2-DG, razonando que si, efectivamente los mutantes presentaban problemas en el transporte de glucosa, deberían presentar tolerancia al compuesto tóxico respecto a la cepa silvestre. Los resultados confirmaron esta posibilidad, atribuyendo a Art4 un papel más relevante en la tolerancia a 2-DG puesto que su delección confiere mayor tolerancia que la mutación de su parólogo ART7, dejando apreciar de este modo sus funciones compartidas aunque también distintas. Realizando el mismo ensayo con mutantes para los principales transportadores de glucosa, se observó que los mutantes para el sensor Snf3 y los transportadores Hxt1 y Hxt3 mostraron cierta tolerancia, estableciéndose una posible relación entre ambas arrestinas, el sensor y los dos transportadores. El origen de la tolerancia a 2-DG en el caso de los mutantes *art4* y *art7*, especialmente en el primero de ellos, podría interpretarse efectivamente como una alteración en el transporte de glucosa. Para intentar esclarecer la eventualidad de esta relación, se marcaron a nivel genómico mediante GFP tanto los transportadores como el sensor en la cepa silvestre y en los fondos mutantes *art4* y *art7*. El estudio de la acumulación de las tres proteínas de membrana no mostró, en un principio, diferencias relevantes respecto a la cepa silvestre, aunque recientemente un estudio ha evidenciado la relación de las α -arrestinas Art4 y Art7 con la endocitosis de Hxt1 y Hxt3 en respuesta a 2-DG (O'Donnell *et al.*, 2014). En este estudio se muestra que la sobreexpresión tanto de Hxt1 como Hxt3 suprime la hipersensibilidad a 2-DG de la cepa *snf1*, al mismo tiempo que este análogo tóxico de la glucosa incentiva el tráfico de ambos transportadores hacia la vacuola, proceso en

el que se encuentran implicadas las α -arrestinas Art4 y Art7, aunque con roles ligeramente diferentes. El mencionado estudio ayuda a explicar los fenotipos observados en el presente análisis en lo que respecta a la tolerancia observada en respuesta a 2-DG. Este análogo tóxico de la glucosa desencadena la endocitosis de Hxt1 y Hxt3, hecho que apoya la observación de que la 2-DG mimetiza un ayuno de glucosa incluso cuando la glucosa presente en el medio es abundante (Kim et al., 2004). En el caso de la tolerancia observada en los mutantes *art4* y *art7*, esta podría estar originada por la supresión total o parcial de la endocitosis de Hxt1 y Hxt3, que por lo tanto quedarían retenidos en la membrana plasmática en niveles superiores respecto a la cepa silvestre y por tanto tendrían mayor capacidad para transportar glucosa al interior de la célula, hecho que les aportaría una ventaja para su supervivencia. Por otra parte, como alternativa cabría la posibilidad de que efectivamente el transporte de glucosa se vea alterado en las cepas *art4* y *art7*, en cuyo caso la raíz de la tolerancia a 2-DG sería el menor transporte de 2-DG al interior celular minimizando por tanto los efectos tóxicos del análogo de la glucosa. En el caso de la resistencia observada en los mutantes *hxt1* y *hxt3* estaría más en concordancia con la segunda hipótesis expuesta, donde la ausencia de Hxt1 y Hxt3 otorgaría tolerancia a las células por el menor transporte de 2-DG al interior de la célula. Por el contrario si la tolerancia a 2-DG observada en los mutantes *art4* y *art7* se debiera a una mayor acumulación de Hxt1 y Hxt3 en la membrana que permitiría un mayor transporte de glucosa y por tanto una mayor capacidad de crecimiento, los mutantes *hxt1* y *hxt3* no deberían presentar tolerancia sino quizás una sensibilidad mayor que la cepa silvestre. En el estudio donde se describe a Hxt1 y Hxt3 como dianas de endocitosis en respuesta a 2-DG, se identificaron los transportadores mediante un rastreo de sobreexpresión que complementara la especial sensibilidad de la cepa $\Delta snf1$ a 2-DG (O'Donell *et al.*, 2014). Quizás en este caso, la sobreexpresión de Hxt1 y Hxt3 sí que aporta una ventaja a la cepa *snf1* al incrementar el flujo de glucosa al interior de la célula, otorgándole a la misma una mejor capacidad de crecimiento frente al falso ayuno originado en respuesta a 2-DG.

Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de tolerancia a 2-DG permiten establecer como efectiva la hipótesis de que en los mutantes *art4* y *art7* se está produciendo un ayuno temprano de glucosa, bien por un funcionamiento inadecuado de los transportadores de hexosas o bien por una localización incorrecta de los mismos.

Por otra parte, nuestros datos revelan una demora en la degradación de Hxt6 en células que sobreexpresan Snf1 o Bmh2. Estas proteínas, implicadas por una parte en la fosforilación y por otra parte en la modulación de la actividad de Art4, podrían estar dificultando o modificando algún aspecto de la interacción Art4-Rsp5 o Hxt6-Rsp5 mediante patrones de fosforilación inadecuados o enmascarando los dominios necesarios para la interacción, fenómeno que desencadenaría una menor tasa de ubiquitinación de Hxt6 en respuesta a altas concentraciones de glucosa y por tanto en un retraso en su degradación.

Además de su rol en la internalización de permeasas mediada por ubiquitina en la superficie celular, Rsp5 también participa en el tráfico intracelular (O'Donell *et al.*, 2010). Esto pone de manifiesto que la regulación mediante la internalización desde la membrana plasmática no es el único mecanismo para controlar la abundancia de transportadores presente en ella. La entrada

de los nuevos transportadores en la ruta de secreción puede regularse de modo que estos vayan directamente a los endosomas/vacuola sin pasar por la membrana plasmática en respuesta a condiciones ambientales específicas. Ejemplo de ello son el transportador de uracilo Fur4 (Blondel *et al.*, 2004) y el transportador general de aminoácidos Gap1 (O'Donnell *et al.*, 2010; Soetens *et al.*, 2001; Heliwell *et al.*, 2001). En ambos casos, su clasificación desde la ruta de secreción hacia la vacuola implica la ubiquitinación por parte de Rsp5. Estos datos, junto a nuestras observaciones en los ensayos de BiFC donde se contempló un cambio en la distribución intracelular de la interacción Hxt6-Art4 tanto en células que sobreexpresan Snf1 como Bmh2, plantean la posibilidad de que la ubiquitinación tenga un papel en este fenómeno. Estudios precedentes en el transportador de lactato Jen1 dejaron evidencia que los estados de fosforilación/ubiquitinación regulan la actividad de Art4, siendo necesaria para la ubiquitinación de Art4 la desfosforilación mediante la fosfatasa PP1 de los patrones de fosforilación originados por Snf1 (Becuwe *et al.*, 2012). De este modo, la sobreexpresión de Snf1 impediría por fosforilación la adecuada ubiquitinación de Art4 o del propio transportador por parte de Rsp5, quedando el complejo Hxt6-Art4 retenido en compartimentos intracelulares al no poseer la señal adecuada para su correcto tráfico. En el estudio inicial que describió a la familia de proteínas ART, se describió como la mutación de la lisina 486 a arginina de Art1 impedía la ubiquitinación por Rsp5 y como consecuencia su deslocalización del Golgi al citoplasma (Lin *et al.*, 2008). Aunque estos datos no presentan relación directa con el presente estudio, apoyan la idea de que variaciones en la ubiquitinación de adaptadores de Rsp5 pueden modificar su localización subcelular. La sobreexpresión de Bmh2 tiene un efecto similar al de Snf1, aunque el origen de la incorrecta localización del complejo Hxt6-Art4 no será en ambos casos exactamente el mismo. En células crecidas en rafinosa, Snf1 se encontrará en su forma activa y fosforilará a Art4 creando sitios de unión para Bmh2 que interactuará con Art4. La sobreexpresión de Bmh2 podría estar favoreciendo interacciones inespecíficas Art4-Bmh2 o dímeros Bmh2. Estudios precedentes demostraron como la interacción Bmh2-Art4 coordina la ubiquitinación de Art4 en respuesta a la disponibilidad de glucosa (Becuwe *et al.*, 2012), por lo tanto la sobreexpresión de Bmh2 podría estar modificando la ubiquitinación de Art4 por Rsp5, que tendrá como consecuencia la localización incorrecta del complejo Hxt6-Art4. Aunque la función más conocida de Rsp5, y por tanto de la ubiquitina, es su implicación en la vía endocítica, su función no solo se limita a esta parte del tráfico intracelular, sino que cada vez parece ser más evidente su implicación en otros mecanismos, como por ejemplo la ubiquitinación de Gap1 en la red trans Golgi para ser dirigido a endosomas (Lauwers *et al.*, 2009).

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la presente tesis, corroborados por las observaciones de otros autores en relación a la regulación del transportador de lactato Jen1 que comparte con Hxt6 la vía de regulación por endocitosis que se publicaron durante el transcurso de este trabajo (Becuwe *et al.*, 2012), nos permite proponer de forma coherente y unificada un modelo para la regulación del tráfico del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 en respuesta a cambios en la fuente de carbono. Además del papel de Art4 en la endocitosis de Hxt6, la observación de que la interacción de ambas proteínas se produce en compartimentos intracelulares (RE/Golgi/vesículas/vacuola) además de en la membrana plasmática, sugiere que el complejo Hxt6-Art4 junto con la E3 ubiquitina ligasa Rsp5, que demostró interactuar

con Art4 en todas las condiciones de crecimiento probadas (Becuwe *et al.*, 2012), formará un complejo ternario Hxt6-Art4-Rsp5. En bajas concentraciones de glucosa Bmh2, a través de la fosforilación de Art4 promovida por Snf1, se unirá a este complejo que acompañará a Hxt6 hasta la membrana plasmática en condiciones de baja disponibilidad de glucosa. Por el contrario, la adición de glucosa provocaría la desfosforilación de Art4 por la subunidad catalítica de PP1, Glc7, que supondrá la pérdida de la interacción con Bmh2 y la recuperación de la función de Art4 en la endocitosis, que destinará a Hxt6 a entrar en la vía endocítica hasta ser degradado en la vacuola.

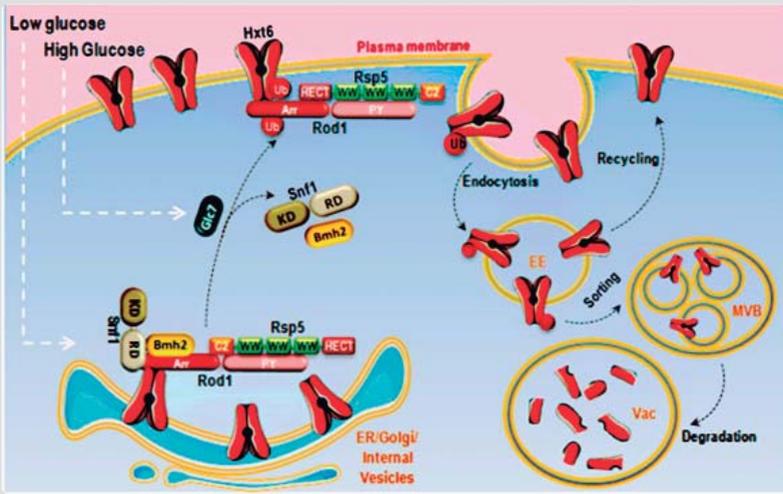


Figura 47. Modelo de la llegada de Hxt6 a la membrana y posterior endocitosis donde se muestra la interacción entre Hxt6 y Art4 en compartimentos intracelulares que junto a Snf1 y Bmh2 estarán implicados en la llegada de Hxt6 hasta la membrana, asegurando su correcta inserción en la misma en condiciones escasez de glucosa. En respuesta a la adición de glucosa y tras la correcta ubiquitinación del transportador tras la salida de Snf1 y Bmh2 del complejo, se producirá la endocitosis de Hxt6, que destinará a Hxt6 a pasar por endosomas y cuerpos multivesiculares antes de ser degradado en la vacuola.

A raíz del trabajo publicado sobre TXNIP, α -arrestina de mamíferos, y su implicación en la regulación del transporte de glucosa a través de una ruta que implica a AMPK y la internalización de GLUT1 (Wu *et al.*, 2013), es imposible no establecer algunos paralelismos entre mamíferos y levaduras. Al igual que Art4, TXNIP es necesaria para la endocitosis del transportador de glucosa GLUT1, y AMPK, homólogo en humanos de Snf1, participa en su regulación mediante fosforilación, que destina a TXNIP a ser degradada como mecanismo de prevención de la internalización de GLUT1 en condiciones de escasez de glucosa (Wu *et al.*, 2013). Nuestras observaciones muestran una mayor acumulación de Art4, y también de Art7, en células crecidas en glucosa o tras la adición de la misma a cepas crecidas en fuentes de carbono no preferidas

como la rafinosa. Estos datos parecen estar en concordancia con estudios precedentes donde se describía que tras la adición de glucosa al medio tiene lugar la ubiquitinación de Art4 después de producirse su desfosforilación, fenómeno necesario para su activación y participación en endocitosis (Becuwe *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran la acumulación de Art4 cuando la glucosa es la fuente de carbono presente en el medio, situación en la que Art4 se encontrará ubiquitinada y activa para intervenir en la endocitosis de Hxt6 cuando éste no sea requerido en la membrana plasmática. Por el contrario, los niveles de Art4 son imperceptibles en células crecidas usando rafinosa como fuente de carbono y del mismo modo estos niveles se ven disminuidos cuando se sustituye la fuente de carbono de glucosa a rafinosa. Este fenómeno señala que la forma fosforilada de Art4, observada en respuesta a bajos niveles de glucosa, es más inestable y por tanto podría estar implicada directamente en su degradación, evitando así su posible papel en la endocitosis de Hxt6 cuando este transportador sea necesario para mantener niveles intracelulares de glucosa adecuados. Aunque el fundamento de este mecanismo es poco conocido en levadura, sería probable que la fosforilación de Art4 por Snf1 desencadenara la degradación de Art4 en condiciones de baja glucosa, como recientemente ha sido descrito en el caso de Art7 (O'Donell *et al.*, 2014). Además de las similitudes ya expuestas, la delección de TXNIP incrementa de manera importante los niveles del transportador GLUT1 y este aumento viene explicado en parte por un incremento en los niveles del mRNA de GLUT1, del mismo modo que ocurre en el caso de Hxt6 y el mutante *art4*, demostrando una vez más que las analogías entre levadura y mamíferos, a pesar de ser en muchos casos imperfectas, pueden resultar de gran utilidad para el entendimiento de mecanismos celulares básicos que permiten obtener las primeras pistas sobre el funcionamiento en organismos superiores.



Conclusiones

1. El transportador de potasio Trk1 es diana de ubiquitinación y la E3 ubiquitina ligasa Irc20 es candidata a llevar a cabo la conjugación entre transportador y ubiquitina.
2. La actividad de la ATPasa de protones Pma1 se ve incrementada durante los quince minutos posteriores a un ayuno de potasio, confirmando la predicción de un modelo matemático.
3. La proteína quinasa Snf1 interacciona físicamente tanto con Art4 como con Art7, pero no con los demás miembros de la familia ART ensayados.
4. Las proteínas 14-3-3 interaccionan físicamente con las proteínas ART 1, 2, 4, 6, 7, 8 y 9. Estos datos sugieren un mecanismo de regulación extendido entre los miembros de la familia ART, siendo la fosforilación de algunos de sus miembros, como Art4, importantes para la interacción Art4-14-3-3.
5. Snf1 interacciona a través de su dominio regulador con la mitad N-terminal de Art4, fragmento con el que también interaccionan las proteínas 14-3-3 de manera fosfodependiente, estableciéndose así la formación del complejo Art4-Snf1-14-3-3.
6. Se ha demostrado por primera vez la interacción física entre Hxt6 y Art4, la cual se produce no solo cuando Hxt6 necesita ser endocitado tras un cambio en la fuente de carbono de rafinosa a glucosa, sino también en células crecidas en rafinosa como fuente de carbono. Esta observación

podría implicar a Art4 no solo en el proceso de endocitosis sino también en el tráfico intracelular de Hxt6. Tanto la quinasa Snf1 como las proteínas 14-3-3 tienen un efecto sobre la localización subcelular del complejo Hxt6-Art4, así como sobre la endocitosis y degradación de Hxt6.

7. La disrupción tanto de *ART4* como de *ART7* origina niveles de transportador Hxt6 muy superiores a los que presenta una cepa silvestre. En el caso de la cepa mutante *art4*, estos niveles anómalos tienen, en parte, origen transcripcional.

8. La disrupción de *ART4* y *ART7* no tienen un efecto sobre la acumulación de los transportadores Hxt1 y Hxt3 en las condiciones ensayadas, aunque no se pueden descartar otras implicaciones de Art4 y Art7 en su regulación.

9. Los ensayos con el análogo tóxico de la glucosa, 2-DG, muestran que el transporte de glucosa se encuentra afectado en los mutantes *art4* y *art7*. Del mismo modo sugieren que en la regulación de los transportadores Hxt1 y Hxt3 también se encuentran implicadas las α -arrestinas Art4 y Art7, aunque no en las condiciones testadas.



Anexos*

*Durante la ejecución de esta tesis doctoral, se ejecutó un trabajo de investigación paralelo que se presenta en el Anexo 1. Los datos y resultados que se muestran a continuación fueron obtenidos en colaboración con la empresa DualSystems Biotech.

Anexo 1



Mejora del sistema Split-Trp: una plataforma versátil para la detección de interacciones proteína-proteína

1. Mejora del sistema Split-Trp: una plataforma versátil para la detección de interacciones proteína-proteína

Los sistemas basados en el doble híbrido en levadura son potentes herramientas para la detección y caracterización de las interacciones proteína-proteína (IPP). Sin embargo, algunos tipos de proteínas como las proteínas integrales de membrana o los factores de transcripción no pueden ser estudiados mediante el uso de esta técnica. El desarrollo, por tanto, de nuevas plataformas que solucionen este tipo de limitaciones resultan de especial interés. La técnica Split-Trp detecta las IPP a través de la reconstitución de la proteína sensor Trp1, permitiendo a las células *trp1* crecer en medio carente de triptófano (Figura A1.1). El sensor deriva de una enzima monomérica de 24 KDa que cataliza la isomerización del N-(5'-fosforibosil)-antranilato en la ruta de biosíntesis del triptófano en *Saccharomyces cerevisiae* (Tafelmeyer *et al.*, 2004). Dado que la interacción supone la reconstitución directa de Trp1 y es independiente de la activación de reporteros transcripcionales, el número esperado de falsos positivos podría verse reducido significativamente. Además, esta tecnología permitiría la detección de las IPP en su localización nativa como el citosol, el núcleo, la membrana plasmática o las membranas de compartimentos intracelulares.

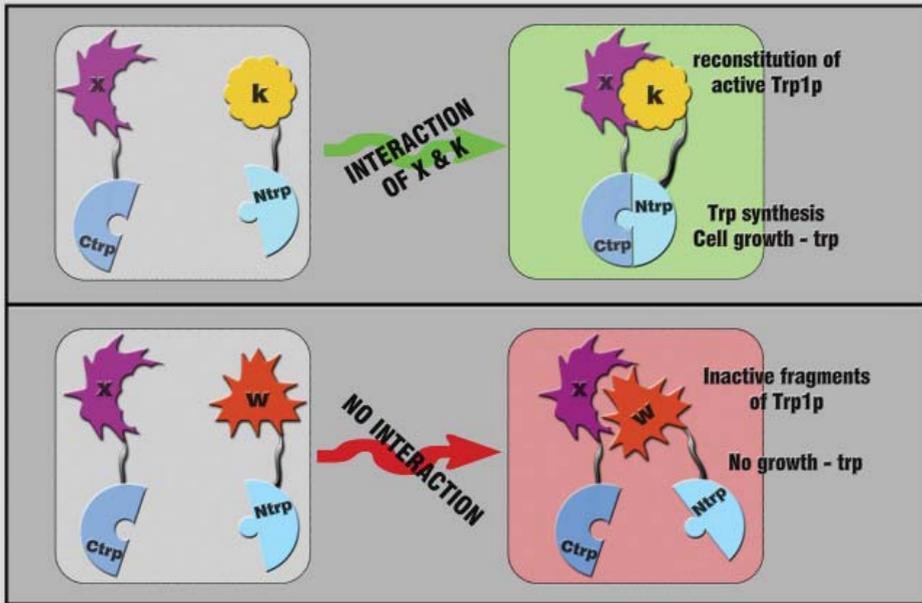


Figura A1.1. Modelo del sistema Split-Trp, donde queda representado el fundamento de la técnica. La interacción entre dos proteínas fusionadas a las mitades N-terminal y C-terminal de Trp1 permitirá la reconstitución de la enzima funcional Trp1 otorgando a las células portadoras la capacidad de crecer en ausencia de triptófano en el medio.

Una de las limitaciones encontradas durante el desarrollo de esta técnica fue la dificultad para la detección de interacciones débiles. Se postuló que la causa podría deberse a los bajos niveles de expresión derivados de la utilización de vectores que contienen orígenes de replicación CEN/ARS, hecho que podría encontrarse acentuado en el caso de expresión de proteínas heterólogas.

La forma en la que se decidió abordar el problema fue mediante la sustitución de los orígenes de replicación de copia única CEN/ARS por secuencias 2μ , que permiten la acumulación de hasta 50 copias de vector por célula, incrementando de este modo los niveles de expresión de la proteína.

Con los vectores 2μ generados, se analizó mediante ensayos de crecimiento en medio sólido si la sensibilidad del sistema se veía incrementada con los cambios realizados, utilizando como controles el sistema de interacción fuerte p53-p53 y la interacción débil p53-Mdm2, al mismo tiempo que se utilizaron los controles necesarios para detectar la aparición de posibles falsos positivos. Dado que la expresión tanto de la proteína cebo como de la presa están sometidas al control del promotor del gen *CUP1*, la flexibilidad del sistema se ve incrementada al poder manipular de manera adicional los niveles de expresión mediante la adición de CuSO_4 , controlando así los niveles de proteínas que pudieran resultar tóxicas al ser expresadas en levadura.

En resumen, nuestra aportación a la mejora de la técnica Split-Trp consistió en sustituir los orígenes de replicación CEN/ARS por los orígenes 2μ para, a continuación, observar si los cambios realizados en los plásmidos suponían una mejora en la sensibilidad del sistema.

1.1. Generación de vectores

Para sustituir el origen CEN/ARS por un origen 2μ , se amplificaron por PCR los vectores cebo y presa sin el origen CEN/ARS y del mismo modo se procedió con el origen de replicación 2μ .

Los siguientes 6 fragmentos de PCR fueron amplificados.

- p-I-CTrp3 (vector vacío cebo, control)
- p-p53-CTrp3
- pNTrp-I (vector vacío presa, control)
- pNTrp-p53
- pNTrp-Mdm2
- Origen de replicación 2μ

Los fragmentos de PCR fueron purificados con el kit GeneClean Turbo (MP Biomedicals) después de ser separados en un gel de agarosa. Debido a que los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR carecen del grupo 5'-fosfato necesario para el siguiente paso de ligación, el fragmento de PCR correspondiente al origen 2μ se fosforiló utilizando una polinucleótido quinasa atendiendo a las recomendaciones del proveedor (Fermentas).

1.2. Clonaje

Los vectores amplificados se combinaron con el origen 2μ fosforilado y una DNA ligasa en diferentes reacciones de ligación. Como consecuencia de la falta de un grupo 5'-fosfato en los extremos de los vectores amplificados la auto-ligación de los plásmidos fue eludida. El clonaje del origen 2μ fue no-direccional, puesto que la orientación del mismo no afecta a su función.

Las siguientes fueron las reacciones de ligación llevadas a cabo:

1. p-I-CTrp3 (fragmento de PCR) + 2μ (fragmento de PCR)
2. p-p53-CTrp3 (fragmento de PCR) + 2μ (fragmento de PCR)
3. pNTrp-I (fragmento de PCR) + 2μ (fragmento de PCR)
4. pNTrp-p53 (fragmento de PCR) + 2μ (fragmento de PCR)
5. pNTrp-Mdm2 (fragmento de PCR) + 2μ (fragmento de PCR)

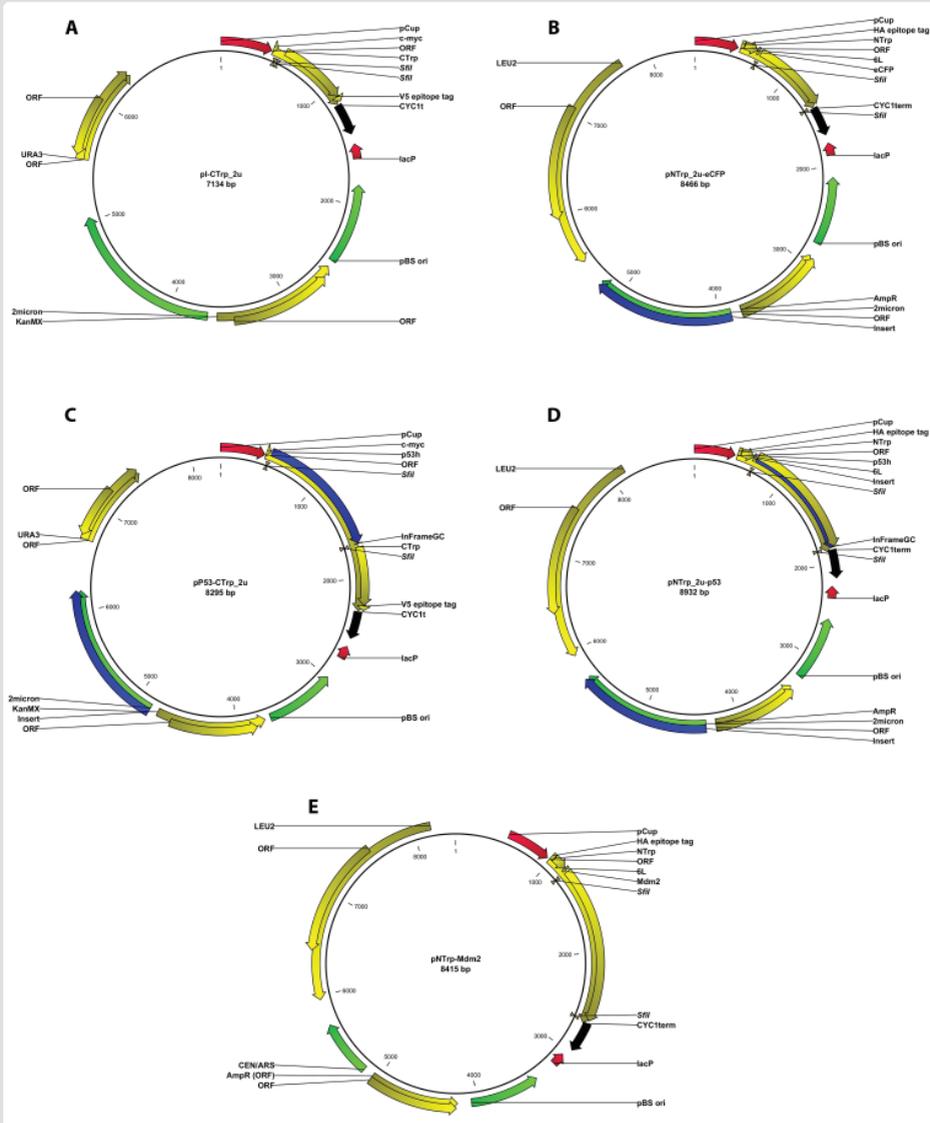


Figura A1.2. Nuevos vectores obtenidos tras la sustitución de los orígenes de replicación CEN/ARS por los 2 μ . (A) Vector para la obtención de la fusión de la proteína cebo. Vector vacío (B) Vector para la obtención de la fusión de la proteína presa. En este caso el vector contiene la proteína fluorescente azul eCFP. (C) Vector para la fusión de p53 a la parte CTrp, que será utilizado como control de interacción fuerte. (D) Vector para la obtención de la proteína p53 fusionada a NTrp, que será utilizado como control de interacción fuerte al enfrentarlo a la fusión p53-CTrp. (E) Vector para la obtención de la fusión de Mdm a la parte NTrp, que será utilizado como control de interacción débil al enfrentarlo a la fusión p53-CTrp. Imágenes adaptadas de DualSystems.

Tras la ligación, las muestras fueron transformadas en *E.coli* y los plásmidos fueron amplificados y purificados mediante técnicas estándar. Con el DNA purificado a partir de las colonias positivas, se llevaron a cabo digestiones con enzimas de restricción y PCR para comprobar la correcta inserción del origen de replicación 2μ . Los vectores obtenidos se muestran a continuación (Figura A1.2).

1.3. Transformación en levadura

Los vectores obtenidos y verificados en apartados anteriores se transformaron en la cepa de levadura CRY1 que carece del gen endógeno *TRP1*. Las siguientes combinaciones de vectores cebo y presa (Tabla A1.1) fueron utilizadas para examinar el posible incremento de la sensibilidad del sistema.

Las células sometidas a la transformación fueron seleccionadas en medio -Ura -Leu y las colonias positivas fueron sometidas a análisis de crecimiento en medio sólido.

Tabla A1.1. Combinación de los diferentes vectores para la comprobación de la mejora del sistema Split-Trp.

	Vector Cebo	Vector Presa
1	p-p53-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-I (CEN/ARS)
2	p-I-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-p53 (CEN/ARS)
3	p-I-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-Mdm2 (CEN/ARS)
4	p-p53-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-p53 (CEN/ARS)
5	p-p53-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-Mdm2 (CEN/ARS)
6	p-p53-CTrp3 (2μ)	pNTrp-I (2μ)
7	p-I-CTrp3 (2μ)	pNTrp-p53 (2μ)
8	p-I-CTrp3 (2μ)	pNTrp-Mdm2 (2μ)
9	p-p53-CTrp3 (2μ)	pNTrp-p53 (2μ)
10	p-p53-CTrp3 (2μ)	pNTrp-Mdm2 (2μ)
11	p-p53-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-I (2μ)
12	p-p53-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-p53 (2μ)
13	p-p53-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-Mdm2 (2μ)
14	p-I-CTrp3 (CEN/ARS)	pNTrp-Mdm2 (2μ)

1.4. Goteos en medio selectivo

Para la comprobación de la eficiencia del nuevo sistema, las colonias co-transformadas con las diferentes combinaciones de vectores fueron crecidas en medio líquido hasta alcanzar la saturación y sometidas a diluciones seriadas, según la siguiente metodología.

Diluciones:

D1: 20 μ L de cultivo saturado + 180 μ L agua Mili Q (1/10)

D2: 20 μ L de D1 + 180 μ L agua Mili Q (1/100)

Placas:

SD -UL

SD -ULW

SD -ULW + sulfato de cobre (CuSO_4) concentración final 100 μ M

1.5. Resultados

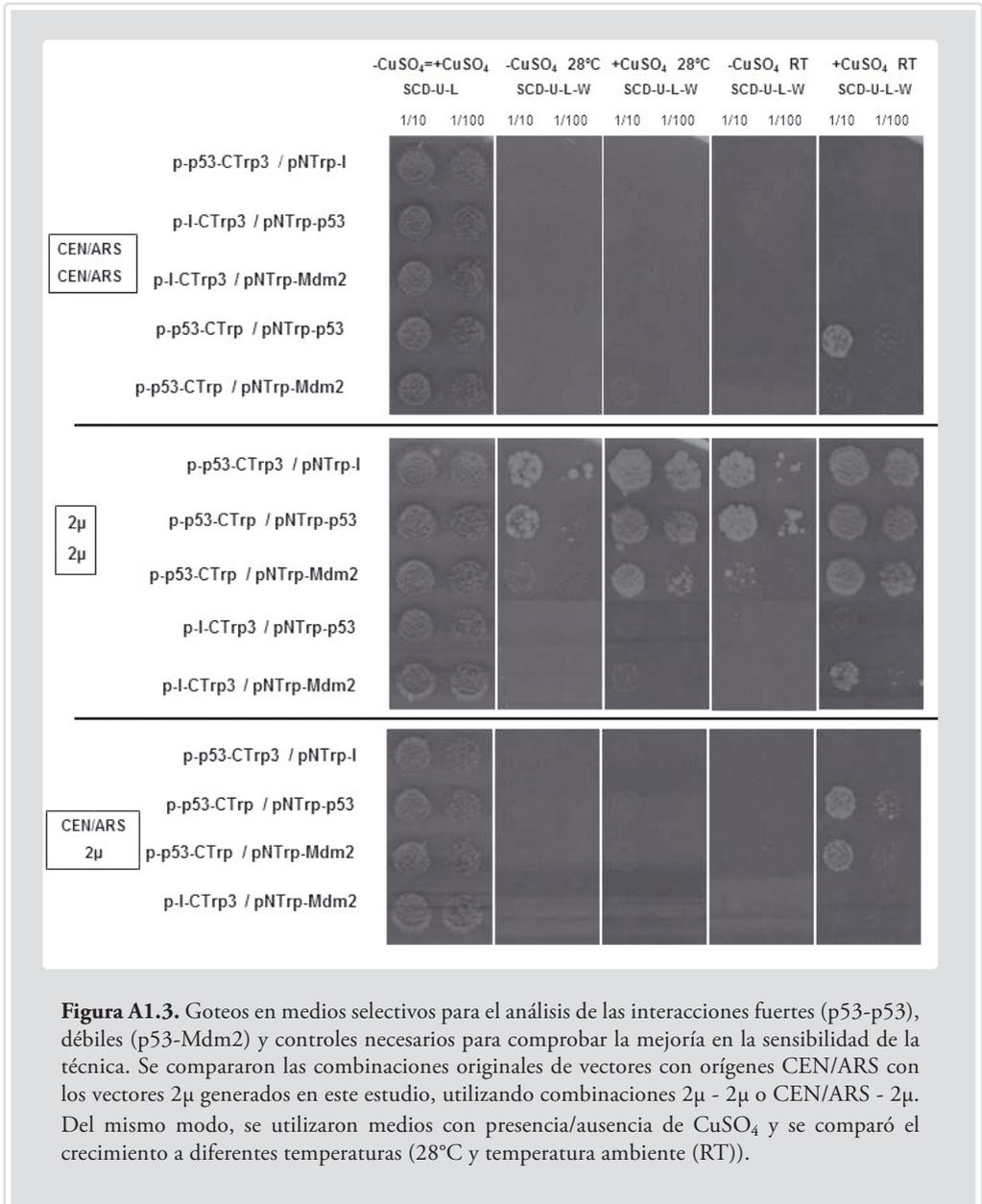
Como observaron con anterioridad el personal técnico de DualSystems, las cepas transformadas con p-p53-CTrp3 (CEN/ARS) / pNTrp-I-p53 (CEN/ARS) crecían en ausencia de triptófano en placas que contenían 100 μ M CuSO_4 a temperatura ambiente (Fig 3). También se observó la aparición de pequeñas colonias en cepas que contenían p-p53-CTrp3 (CEN/ARS) / pNTrp-I-Mdm2 (CEN/ARS) después de 6 días de incubación.

En el caso de las cepas transformadas con los nuevos vectores con orígenes de replicación 2 μ , se observaron los siguientes resultados destacables (Figura A1.3):

1. Crecimiento robusto en medio -Trp de las cepas p-p53-CTrp3 (2 μ) / pNTrp-I-p53 (2 μ) bajo todas las condiciones probadas (+/- CuSO_4 , 28°C, RT (25°C)) en 3 días.
2. Una relevante mejora en el crecimiento de cepas que contenían los vectores p-p53-CTrp3 (2 μ) / pNTrp-I-Mdm2 (2 μ) en placas que contenían CuSO_4 a cualquiera de las temperaturas comprobadas después de 6 días de incubación.

La mejora en el crecimiento de las cepas portadoras de las versiones 2 μ de los vectores Split-Trp, tanto en el caso de la interacción fuerte como en la débil, es un indicador del incremento de la sensibilidad del sistema debido al aumento del número de copias del plásmido.

Sin embargo, un posible inconveniente del incremento en el número de copias es la aparición de crecimiento en cepas portadoras de combinaciones de vectores que representan controles negativos. Pudimos observar crecimiento robusto en cepas portadoras de p-p53-CTrp3 (2 μ) /



pNTrp-I (2μ) en todas las condiciones testadas. Además, también se observó crecimiento en cepas portadoras de la combinación p-I-CTrp3 (2μ) / pNTrp-I-Mdm2 (2μ) en placas que contenían CuSO₄ crecidas a temperatura ambiente, aunque en tasas mucho menor que en el caso anterior (Figura A1.3). Esto podría suponer un inconveniente ya que, en aquellos casos en los que se utilice una proteína cebo que se exprese a niveles elevados en levadura, podría dar origen a falsos positivos.

La aparición de este fondo en el ensayo podría deberse al exceso de producción de la proteína cebo p53, que encontraría al fragmento NTrp en el retículo endoplasmático (ER) permitiendo la reconstitución no específica de la proteína Trp1. Sin embargo, es probable que en futuras aplicaciones otras proteínas cebo no se acumulen en grados similares a p53-CTrp3 y por tanto ese crecimiento no específico se vea reducido considerablemente.

Tratando de minimizar la aparición de este crecimiento no específico, que podría limitar la aplicación de este sistema de detección de interacciones proteína-proteína en algunos contextos, se decidió comprobar una tercera combinación de vectores: vectores cebo que contenían orígenes CEN/ARS y vectores presa con orígenes 2μ . Se postuló que si se reducía la expresión de las fusiones CTrp, se moderaría la acumulación en el ER y por tanto disminuiría el crecimiento no específico observado en las combinaciones 2μ .

Como se observa en los paneles inferiores de la figura A1.3, la combinación CEN/ARS- 2μ aporta una mejora considerable en el crecimiento tanto de la interacción fuerte como de aquella débil al ser comparado con los vectores CEN/ARS, tras 6 días de incubación a temperatura ambiente en placas que contenían CuSO_4 . Además, el crecimiento inespecífico observado en las combinaciones 2μ desaparece con la nueva combinación CEN/ARS- 2μ , reforzando así la idea de que la combinación entre vectores puede suponer mejoras en la detección de determinadas interacciones.

En conclusión, dependiendo de la acumulación relativa de la proteína de fusión cebo a ser estudiada, la versión de los plásmidos CEN/ARS o 2μ puede utilizarse para rastrear librerías de vectores 2μ . De acuerdo con el modelo de interacciones probadas en este estudio, tanto las interacciones fuertes como las débiles podrían ser detectadas y el número de falsos positivos esperados sería relativamente bajo.

A pesar de estos resultados positivos y prometedores, los científicos de la empresa DualSystems fueron incapaces de utilizar estos vectores para generar bibliotecas que cumplieran con los requisitos de calidad necesaria y por tanto decidieron abandonar este abordaje.

Los resultados obtenidos en esta colaboración dieron lugar a la siguiente presentación en un congreso internacional.

AUTORES: Vicent Llopis, Lukas Baumann, Mandana Rezwan, Daniel Auerbach, Lynne Yenush.

TÍTULO: Improvement of the Split-Trp system: A versatile protein screening platform for the identification of protein-protein interactions in all cellular compartments.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Vancouver, Canadá

AÑO: 2010

Anexo 2



Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis revealed by mathematical modeling*

***Plos Computational Biology**

Published: June 21, 2012

DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002548

Potassium Starvation in Yeast: Mechanisms of Homeostasis Revealed by Mathematical Modeling

Matthias Kahm¹, Clara Navarrete², Vicent Llopis-Torregrosa³, Rito Herrera², Lina Barreto⁴, Lynne Yenush³, Joaquin Ariño⁴, Jose Ramos², Maik Kschischo^{1*}

1 Department of Mathematics and Technology, RheinAhrCampus, University of Applied Sciences, Koblenz, Remagen, Germany, **2** Department of Microbiology, Campus de Rabanales, University of Córdoba, Córdoba, Spain, **3** Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas UPV-CSIC, Ciudad Politécnica de la Innovación, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain, **4** Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

Abstract

The intrinsic ability of cells to adapt to a wide range of environmental conditions is a fundamental process required for survival. Potassium is the most abundant cation in living cells and is required for essential cellular processes, including the regulation of cell volume, pH and protein synthesis. Yeast cells can grow from low micromolar to molar potassium concentrations and utilize sophisticated control mechanisms to keep the internal potassium concentration in a viable range. We developed a mathematical model for *Saccharomyces cerevisiae* to explore the complex interplay between biophysical forces and molecular regulation facilitating potassium homeostasis. By using a novel inference method (“the reverse tracking algorithm”) we predicted and then verified experimentally that the main regulators under conditions of potassium starvation are proton fluxes responding to changes of potassium concentrations. In contrast to the prevailing view, we show that regulation of the main potassium transport systems (Trk1,2 and Nha1) in the plasma membrane is not sufficient to achieve homeostasis.

Citation: Kahm M, Navarrete C, Llopis-Torregrosa V, Herrera R, Barreto L, et al. (2012) Potassium Starvation in Yeast: Mechanisms of Homeostasis Revealed by Mathematical Modeling. PLoS Comput Biol 8(6): e1002548. doi:10.1371/journal.pcbi.1002548

Editor: Arne Elofsson, Stockholm University, Sweden

Received: December 5, 2011; **Accepted:** April 23, 2012; **Published:** June 21, 2012

Copyright: © 2012 Kahm et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Maik Kschischo and Matthias Kahm were supported by BMBF grant 0315786C (SysMo2/Translucent 2). Work in Joaquin Ariño laboratory was supported by grants BFU2008-04188-C03-01, BFU2011-30197-C3-01, GEN2006-27748-C2-1-E/SYS (SysMo/Translucent) and EUI2009-04147 (SysMo2/Translucent 2), from the MICINN, Spain. Joaquin Ariño was the recipient of an Ajut 2009SGR-1091 and an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya). Work in José Ramos laboratory was supported by grants GEN2006-27748-C2-2-E/SYS (SysMo/Translucent), BFU2008-04188-C03-03 and EUI2009-04153 (SysMo2/Translucent 2), (MICINN, Spain). Work in Lynne Yenush laboratory was supported by grants BFU2008-04188-C03-02, BFU2011-30197-C03-03 (MICINN, Spain) and ACOMP/2011/024 (Generalitat Valenciana). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: kschischo@rheinahrcampus.de

Introduction

Potassium is an essential cation required for many cellular processes including the regulation of cell volume, intracellular pH, protein synthesis, activation of enzymes, and maintenance of the plasma membrane potential [1–4]. In their natural environment, most cell types have to accumulate intracellular potassium against a strong concentration gradient. Animal cells utilize the energy stored in ATP to directly pump potassium ions into the cell via the Na⁺/K⁺ ATPase. This enzyme is absent in most fungi and plants [2], which have developed alternative mechanisms to control the intracellular potassium concentration. *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) cells can grow in media with a potassium concentration ranging from 10 μM to 2.5M. Despite extensive knowledge about the identity and function of most potassium transporters in this organism [3], a systems level understanding of the interplay and regulation of the various transport pathways is still lacking.

In *S.c.*, uptake of potassium across the plasma membrane is driven by the membrane potential, which itself is generated by proton pumping via the H⁺-ATPase, Pma1 [5,6]. The high affinity and high velocity transporter, Trk1, is the major uptake system for potassium. The expression levels of the other Trk protein, Trk2, are low, compared to Trk1, and therefore

considered of minor importance [7,8]. A low affinity uptake observed by electrophysiological techniques in *trk1,2* double mutants has been attributed to the putative calcium blocked channel Nsc1, though the gene responsible for this transport activity has not been found yet [9,10]. Efflux of potassium is strongly pH-dependent and coupled to sodium toxicity. The antiporter Nha1 extrudes Na⁺ or K⁺ ions in exchange for protons under acidic environmental conditions and contributes to the continuous cyclic flux of potassium ions across the plasma membrane and to pH regulation [11,12]. It is only at higher external pH that potassium or sodium is actively extruded by the Ena1 ATPase [13–15]. Another potassium efflux system is the voltage gated channel, Tok1. Electrophysiological studies revealed that Tok1 opens at positive membrane potentials, which do not occur under normal physiological conditions [16]. Potassium is also stored in intracellular compartments, in particular in the vacuole. The effect of intracellular transport is, however, not sufficiently characterized yet [3,17].

Besides protons, a number of other ions are associated with the transport of potassium. The anion bicarbonate was shown to be important for potassium accumulation [18]. Decarboxylation reactions produce carbon dioxide, which is quickly converted to carbonic acid (H₂CO₃), by carbonic anhydrase. Carbonic acid can

Author Summary

Without potassium, all living cells will die; it has to be present in sufficient amounts for the proper function of most cell types. Disturbances in potassium levels in animal cells result in potentially fatal conditions and it is also an essential nutrient for plants and fungi. Cells have developed effective mechanisms for surviving under adverse environmental conditions of low external potassium. The question is how. Using the eukaryotic model organism, baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), we modeled how potassium homeostasis takes place. This is because, through mathematical modeling and experimentation, we found that the electro-chemical forces regulating potassium concentrations are coupled to proton fluxes, which respond to external conditions in order to maintain a viable potassium level within the cells. Our results challenge the current understanding of potassium homeostasis in baker's yeast, and could potentially be extended to other microorganisms, including non-conventional yeasts such as the pathogenic *Candida albicans*, and plant cells. In the future, the fundamental bases for this descriptive and predictive model might contribute to the development of new treatments for fungal infections, or developments in crop sciences.

either diffuse freely across the cell membrane or dissociate into bicarbonate (HCO_3^-), and protons. While protons can be extruded via Pma1, the permeability of bicarbonate is very low compared to that of carbonic acid. The resulting accumulation of bicarbonate provides the link to potassium homeostasis; the negative charges carried by bicarbonate can be balanced by potassium cations. In principle, other weak acids could contribute in a similar way to potassium accumulation, but our results below and previous investigations suggest that the bicarbonate reaction plays an important role [18]. Potassium transport is also related to ammonium toxicity [19]. Under low external potassium conditions, ammonium leaks into the cells, presumably via potassium transporters. Toxic concentrations of ammonium are counteracted by increased production and excretion of amino acids [19].

The maintenance of a minimal potassium concentration requires the orchestration of the different transport systems under the constraints of various thermodynamic forces. In this article, we use a mathematical model in conjunction with a novel inference algorithm (the reverse tracking algorithm) and model-driven experimentation to identify the key transport mechanisms that must be regulated under the conditions of potassium shortage. We show that the activation of the proton pump, Pma1, and the activation of the bicarbonate reaction sequence are the regulators of potassium homeostasis. We also show that potassium homeostasis is an example of non-perfect adaptation: The intracellular potassium concentration depends on the external potassium concentration and is only regulated to keep minimal levels of potassium required for survival. This is different from other homeostatic systems such as osmoregulation [20], where certain stationary systems characteristics perfectly adapt, irrespective of the external conditions.

Results

Potassium starvation experiments

To study the response of *S.c.* cells to an abrupt decrease of external potassium, we performed potassium starvation experiments using K^+ and Na^+ free media. Cells grown in non-limiting

potassium (50mM KCl) were washed with K^+ -free YNB medium (YNB without amino acids and ammonium sulphate, Formedium UK, CYN7505 plus 2% glucose, traces of KCl left: 15 μM , hereafter referred to as Translucent K^+ -free medium [21]) and resuspended in the same medium [12]. The time course for changes in intracellular potassium concentrations for the wild type strain exhibits two different phases (Figure 1A). In the first hour of starvation there is a large net efflux of potassium indicated by the rapid decrease in the intracellular concentration. Loss of potassium slows down in the second phase and the internal concentration slowly approaches a new stationary state (Table 1). Although the cells cannot perfectly adapt to the large concentration gradients they are able to keep a certain amount of potassium required for survival (approx. 30mM). Interestingly, the second phase of potassium loss is slower for the *trk1,2* double mutant than for the wild type (wt). This is surprising, because it is believed [3] that increased uptake of potassium via Trk1 even at very low external potassium concentrations is a major mechanism of potassium homeostasis. Thus, one would have expected the concentration of internal potassium in the *trk1,2* mutant to be lower than in the wild type. The time course for the *nhl1* mutant is not significantly different from the *trk1,2* mutant (see also Figure S7 in Text S1).

A mathematical model for potassium transport

Multiple signaling pathways modulate the activity of the various transport systems involved in potassium homeostasis [2–6,14,15,22–24]. However, it is not entirely clear which of these signals are essential to achieve homeostasis and how they are acting under the constraints set by the thermodynamics of ion transport. To study these constraints, we developed a minimalistic mathematical model which incorporates the essential parts known to be important for potassium homeostasis. The model describes the dynamic coupling between the intracellular potassium concentration $[\text{K}^+]_i$, internal pH ($p\text{H}_i$), carbon dioxide concentration $[\text{CO}_2]$, membrane voltage V_m , and cell volume V . A complete description of the equations and parameter values is given in the Materials and Methods section and derivations can be found in the Text S1. Here, only the basic model structure is given:

$$\frac{d}{dt}[\text{K}^+]_i = - \left(J_K^{\text{Trk1,2}} + J_K^{\text{Nhl1}} + J_K^{\text{Tok1}} + J_K^{\text{leak}} \right) \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt}[\text{CO}_2] = - \left(J_{\text{H}_2\text{CO}_3}^{\text{transport}} + J_{\text{HCO}_3^-}^{\text{transport}} + J_{\text{CO}_2}^{\text{prod}} \right) \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt}p\text{H}_i = \frac{1}{\beta} \left(J_H^{\text{Pma1}} + J_H^{\text{Nhl1}} + J_H^{\text{leak}} + (1-\alpha)J_{\text{H}_2\text{CO}_3}^{\text{transport}} + \alpha J_{\text{HCO}_3^-}^{\text{transport}} \right) \quad (3)$$

$$V_m = - \frac{F \cdot V}{C_m \cdot A} (\beta \cdot p\text{H}_i - [\text{K}^+]_i + [\text{HCO}_3^-]_i - [\text{Z}]) \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt}V = L_p \cdot A \cdot (\Pi_i - \Pi_0 - \Pi_i). \quad (5)$$

Equation (1) links the temporal change of the intracellular potassium concentration to the various potassium transport fluxes

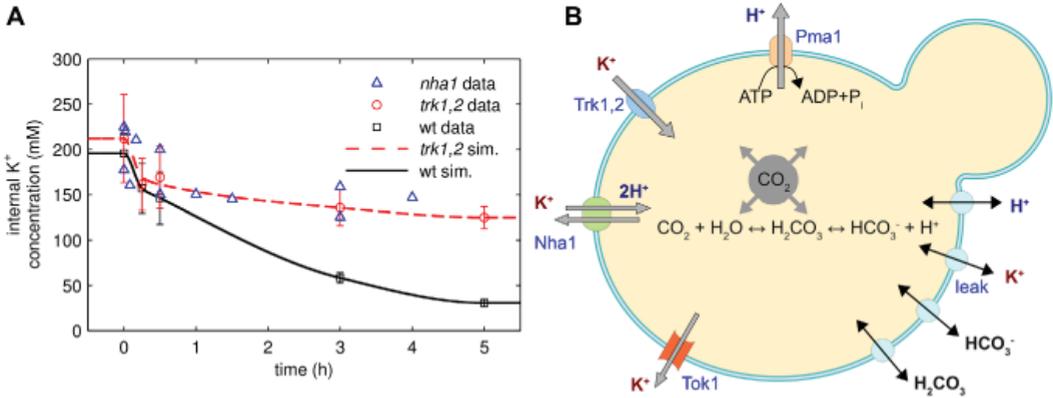


Figure 1. Homeostatic response to potassium starvation. (A) Experimental time courses of internal potassium concentrations in wild-type (WT) cells, *trk1,2* double mutants and *nha1* mutants (symbols). Cells were grown in 50 mM KCl and resuspended in Translucent K⁺-free medium at *t*=0. Solid lines (“sim”) are fits to the model using the reverse tracking approach (see text). (B) The components of the minimal biophysical model. doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g001

J_K (Figure 1B). The model comprises the Trk1,2 system (abstracted as a single system, $J_K^{Trk1,2}$), the Nha1 antiporter (J_K^{Nha1}), and the Tok1 channel (J_K^{Tok1}). To mimic the joint contribution of other, mainly non-specific transport pathways for potassium (e.g. Nsc1) we added a potassium leak current J_K^{leak} to the model. The Ena1 ATPase is neglected because it is known to be inactive at the relatively low external pH used in the experiments [15].

The dynamics of carbon dioxide (Equation (2)) is coupled to the transport fluxes of bicarbonate $J_{HCO_3^-}^{transport}$ and carbonic acid $J_{H_2CO_3}^{transport}$. These transport rates are given in the Materials and Methods section (Equations (18–19)) and a detailed derivation of the bicarbonate model [25] is given in the Text S1. Carbon dioxide is produced in various metabolic processes such as the TCA cycle or pyruvate decarboxylation. It is impossible to model all these processes explicitly, but we incorporate them in the effective metabolic carbon dioxide production flux $J_{CO_2}^{prod}$. This flux is an input to the model and was initially assumed to be constant.

The change in pH (Equation (3)) per change in proton concentration is described by the buffering capacity β . In principle, β is a function of the internal pH, but due to the combined action of various buffering species [26] it can be approximated by a constant for a wide range of intracellular pH values. In addition to the proton fluxes via the H⁺-ATPase Pma1 (J_H^{Pma1}) and the Nha1 antiporter (J_H^{Nha1}) there are many other proton transport pathways in yeast. The corresponding net flux is

subsumed in the proton leak current J_H^{leak} . The effective proton flux originating from the bicarbonate reaction sequence is given by the term $(1-\alpha)J_{H_2CO_3}^{transport} + \alpha J_{HCO_3^-}^{transport}$, where α is the pH-dependent fraction of dissociated carbon dioxide.

The membrane potential (Equation (4)) is modeled as a charge balance equation (c_m , specific membrane capacitance; F , Faraday constant; A , surface area of the cell) [27]. We explicitly modeled the charges carried by potassium, total protons ($\beta \cdot pH_i$) and bicarbonate. The remaining net charges contributing to the membrane potential are subsumed in $[Z]$, which is determined by the initial conditions of the dynamic variables in the model.

The cell volume (Equation (5)) depends on the balance between internal osmotic pressure Π_i , external osmotic pressure Π_o and turgor pressure Π_t [28]. Ion transport processes change the intra- and extracellular solute concentrations and thus have an osmotic effect (Equations (24–26)) in Materials and Methods). The resistance against volume changes is given by the hydraulic permeability parameter L_p [29].

The concentration and voltage dependent kinetics of all transport systems were described by simple thermodynamic consistent relationships. The driving force for the transport fluxes of ions across the plasma membrane can be written as the difference $V_m - E$ of the membrane potential and the equilibrium potential E . The equilibrium potential depends on the concentrations and stoichiometry of the ions transported, see Equations (12–14) in the Materials and Methods section. For the potassium fluxes in Equation (1) and the proton leak in Equation (3) we assumed linear relations (Ohm’s law) of the form $J \propto I = g(V_m - E)$ between the driving force and the transport flux J , or the corresponding electrical current I , respectively. For the leak currents J_K^{leak} and I_H^{leak} we initially assumed constant conductivity parameters g (Equations (9) and (11) in Materials and Methods). The conductivity of the transport proteins Trk1,2, Nha1 and Tok1 was modeled as a function of the membrane voltage, see Equations (6–8) in Materials and Methods.

This minimalistic model captures the essential biophysical and thermodynamic constraints under which control of potassium homeostasis operates. Despite the simplicity of the model, the experimental data was not sufficient to uniquely identify all the parameters. We decided to use this flexibility to explore the

Table 1. Optical densities during starvation.

Strain	Time of starvation (hours)				
	1	2	3	4	5
wt	0.3	0.39	0.45	0.5	0.5
trk1,2	0.3	0.35	0.4	0.42	0.43

Optical densities for the wild type and the *trk1,2* double mutant corresponding to the potassium starvation experiments of Figure 1A. doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.t001

parameter space for regions that are consistent with the data and performed extensive parameter scans and sensitivity analysis simulations. However, we were unable to identify a single parameter combination which reproduced the experimental time courses for the wild type strain observed in Figure 1A. In the model, all potassium inside the cell was rapidly and completely lost upon starvation (Figure S4A in Text S1). Based on our model simulations, this believed to be caused by a strong efflux via the Nha1 antiporter driven by the large concentration gradient across the plasma membrane. This model behavior is robust against various model variations, including the incorporation of an intracellular potassium storage mechanism that mimics the contribution of intracellular compartments to potassium retention. Thus, we conclude that further dynamic mechanisms counteracting the strong potassium gradient are essential for homeostasis. Importantly, the model described so far incorporates only the biophysics of transport but does not account for gene regulatory, signal transduction or metabolic events affecting the transporter activity.

Predicting the regulators with the reverse tracking algorithm

The fact that the minimal model is not able to reproduce the experimental time courses for potassium starvation means that there are some unmodeled dynamics that are not captured by the model. Under the working hypothesis that the model covers the major biophysical effects of potassium transport we assumed that there are additional regulatory responses to a shortage of potassium. Available knowledge [2,3] and data is currently not sufficient to develop exhaustive models for the metabolic, signal transduction and gene regulatory responses to potassium starvation. It is not even clear which of the transporters or other components are activated or deactivated for the maintenance of homeostasis. In engineering terms [30], neither the regulators nor the signals triggering their action are sufficiently characterized.

To overcome this limitation, we combined our minimal biophysical model with an inference algorithm for unmodeled dynamics. We assumed that the unknown regulatory events modulate the activity of the transport systems or other components in the model. Mathematically this means that a constant parameter in the model might in fact not be constant, but a function of time. For example, the maximum conductivity $g_{Trk1,2}$ (see Equation 6) of the Trk1,2 transport system could be influenced by signal transduction events [3,31] in response to low potassium. Any attempt to explicitly model this regulation by additional equations is hindered by insufficient knowledge of the structure and dynamics of the regulatory networks involved. However, one might recoin the question and ask: "Is there a function $g_{Trk1,2}(t)$ such that the given experimental time course $[K^+]_i^{exp}(t)$ of intracellular potassium and the time course $[K^+]_i(t)$ predicted by the model are in sufficient agreement?". If such a function $g_{Trk1,2}(t)$ would exist we would regard the modulation of the Trk1,2 transporter as one potential regulatory mechanism and Trk1,2 as a *potential* regulator of potassium homeostasis. However, there might be another parameter θ (e.g. $g_{Nha1}, g_{Tok1}, J_{Pma1}^{max}, \dots$) associated with a transporter or another component in the model for which a time course $\theta(t)$ exists such that experimental data can be reproduced. Our strategy was now to test different parameters and corresponding processes for being potential regulators, see Figure 2A. We define a transporter or any other component in the model to be a potential regulator if a tracking control signal $\theta(t)$ exists which changes the activity of the component in such a way that the experimental time course and stationary data can be reproduced. We refer to this inference approach as the reverse

tracking algorithm, a more detailed mathematical explanation is given in Materials and Methods.

We used the reverse tracking algorithm to test the transporters Trk1,2, Ena1, Nha1, Tok1 and Pma1 and the activity of the bicarbonate reaction for being potential regulators of potassium homeostasis and then compared the predicted tracking control signals to experimental observations. There is no tracking control signal for the major uptake system Trk1,2; see Figure S1 in the Text S1. This is in contrast to the prevailing view that increased uptake of potassium via Trk1 is essential for potassium homeostasis under starvation conditions. The loss of potassium after starvation is slower in *trk1,2* double mutants (see Figure 1A) than in wild type cells. It was experimentally observed [12] that these double mutants have a more negative membrane potential than wild type cells under starvation conditions and also when external potassium is plentiful. This stronger membrane potential (see also Figure S3 in the Text S1) counteracts the outwardly directed potassium concentration gradient and thus explains the higher potassium levels after starvation. Taken together, these results show that the uptake of potassium via Trk1,2 is not the primary mechanism to prevent excessive loss of potassium under starvation conditions.

Although we found a tracking control signal for the Nha1 antiporter, we excluded it from our list of potential regulators based on two observations. First, as indicated in Figure 1A, the time course of potassium loss in *nha1* mutants is slower than in the wild type and similar to the *trk1,2* mutants. Secondly, it was demonstrated that the influence of Nha1 on the internal potassium concentrations decreases with time [11]. This is in contradiction to our predicted tracking signal (Figure S2 in Text S1), which is nonmonotonic in time.

Similarly, the unspecific transport pathways (leak currents) were excluded, because it is not plausible that unspecific transporters are regulated for the specific purpose of potassium homeostasis. This is based on the well founded assumption that all potassium specific transporters are active under our experimental conditions are known [3] and included in the model. The non-specific cation uptake system NSC1 can be excluded, because our medium contains enough calcium to render NSC1 inactive [32]. The proton flux J_H^{leak} includes many co-transport mechanisms with nutrients and other molecules. It is thus unlikely, that one of these transport mechanisms is specifically regulated in response to potassium starvation.

The remaining parts in our model are the Pma1 H^+ -ATPase and the bicarbonate reaction sequence. For both of them, the reverse tracking approach predicts a rapid burst of activity in response to the rapid removal of external potassium (Figure 2B and 2C). Activation of proton pumping by Pma1 (Figure 2B) hyperpolarizes the plasma membrane, which counteracts the large concentration gradient of potassium and thus limits potassium efflux. An increased reaction flux (see Figure 2C) through the bicarbonate system has a similar effect: The negative charges carried by bicarbonate increase the magnitude of the membrane potential and thereby compensate the potassium gradient.

Experimental validation of the predicted regulators

To test the prediction that Pma1 is activated after potassium starvation, we measured Pma1 activity from crude membrane preparations [33] using an in vitro method that has been extensively established as a faithful measure of in vivo Pma1 function [6,33,34]. Indeed, the activity measurements confirm the prediction of the reverse tracking algorithm that Pma1 activity increases rapidly (timescale of 10 minutes) and slowly declines during the first hours of potassium starvation (Figure 2D). Control

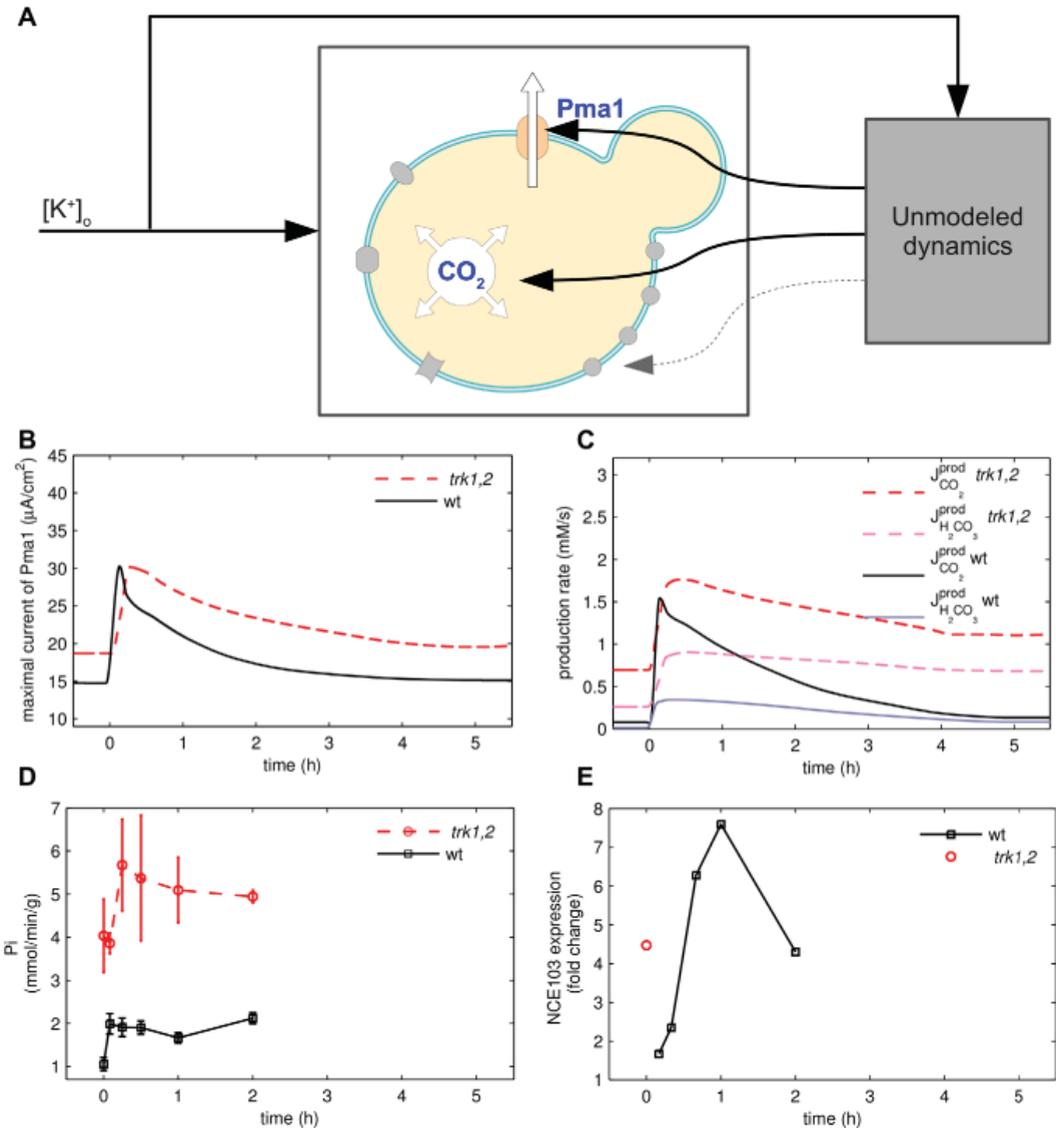


Figure 2. Regulation of potassium starvation. (A) The tracking approach to detect potential regulators of homeostasis. Parameters which are constant in the minimal model are now considered as input functions. A parameter is called a potential regulator if it can be chosen to recover ("track") the experimental time courses. (B,C) The predicted activity changes for Pma1 (B) and the bicarbonate reaction system (C) in response to potassium starvation. (D) Time course of ATPase activity for Pma1. (E) Time course of gene expression for the *NCE103* gene encoding carbonic anhydrase in the wild type strain. Confirmatory qRT-PCR measurements yield a 4.31 ± 0.58 fold increase of the mRNA level in the wild type after 60 minutes of potassium starvation. For comparison, the expression in non-starved *trk1,2* double mutant with respect to the wild type strain is depicted. The mRNA levels for *NCE103* in *trk1,2* double mutants growing at 50mM K^+ are higher by a factor of 4.1 ± 0.82 compared to the wild type strain (qRT-PCR measurements).

doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g002

experiments revealed that Pma1 protein levels do not change under these conditions. Moreover, we also observe, as predicted by the model, that the Pma1 activity is higher in the *trk1,2* mutant than in the wild type strain throughout the time course of

potassium starvation (Figures 2B and D). To further substantiate that the activation of Pma1 is essential for the response to low potassium, we measured growth for Pma1 mutants *pma1-204* and *pma1-205* [35] with decreased expression and ATPase activity (33

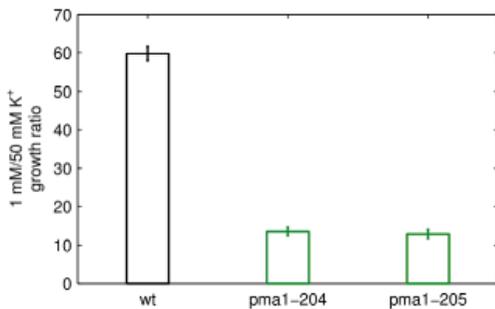


Figure 3. PMA1 mutants with decreased expression and ATPase activity. Strains RS514 (wild type, WT), RS515 (*pma1-204*) and RS516 (*pma1-205*) were grown in YNB-based medium (supplemented with adenine and histidine) with 2% galactose to maintain Pma1 activity from plasmid pYCP50-GALp::PMA1. Cells were diluted to an OD600 of 0.04 in Translucent K⁺-free medium (plus with 2% glucose) containing 1 mM or 50 mM KCl. Growth was monitored for 17 h. Data represent the growth ratio at 1 and 50 mM KCl and are mean \pm SEM from 3 determinations.
doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g003

and 50% of wild type). Figure 3 shows that the ratio of the growth rates at 1 mM and 50 mM external potassium is much lower for the mutant strains than that of the wild type. These results are in line with the recent finding that the *brp1* mutant, which is a *PMA1* promoter deletion, that leads to decreased Pma1 protein levels, presents markedly decreased growth in low potassium medium and defective rubidium uptake [36].

The second prediction from the reverse tracking approach was an increased reaction flux for the bicarbonate system (Figure 2C). This prediction is supported experimentally by an increased mRNA expression of the *NCE103* gene coding for carbonic anhydrase, the enzyme catalyzing the bicarbonate reaction (Figure 2E). This result was part of a genome-wide transcriptomic analysis, using DNA microarrays, of the response to potassium starvation (0–120 min) to be published elsewhere (Barreto et al., submitted). It was shown earlier that protein and mRNA levels of carbonic anhydrase are highly correlated [37]. A qRT-PCR measurement confirmed the increase in *NCE103* expression in wild type cells shifted to K⁺ free medium. After 60 minutes of potassium starvation, the *NCE103* mRNA levels increase more than four-fold (4.31 ± 0.58 , $n = 3$ independent experiments). These results show that activation of both Pma1 and the bicarbonate reaction sequence are essential for the control of internal potassium concentrations. In non-starved cells the expression of *NCE103* is higher for the *trk1,2* double mutant than for the wild type (single dot in Figure 2E). A confirmatory semi-quantitative RT-PCR measurement using the same RNA sample as in the microarray experiment and one RNA sample from independent cultures yielded a mean expression ratio of 4.1 ± 0.82 ($n = 4$ data points) for *trk1,2* relative to the wild type. These results suggest a simple explanation for the reported hyperpolarization of the *trk1,2* double mutant [12]: A high activity of the bicarbonate reaction sequence means that many protons and many bicarbonate ions are produced. Together with a more active proton pump (Figures 2B and D), this results in a more negative membrane potential that counteracts the outwardly directed potassium gradient. The consequence is a higher intracellular concentration of potassium (Figure 1A) in *trk1,2* double mutants than wild type cells.

Non-perfect adaptation to external potassium concentrations

Homeostatic control of a cellular function in response to a changing environment is often mediated by a negative feedback loop. A change in the input signal (e.g. the external potassium concentration) is counteracted by this feedback loop in order to keep an essential cellular quantity (e.g. the intracellular potassium concentration) in a range sufficient for the cell's function. One particular type of feedback is integral control, where the control signal is the time integral of the difference between the reference and the actual quantity [30]. Integral control was observed for a number of cellular processes including bacterial chemotaxis [38,39] and osmoregulation [20]. A characteristic property of integral control is perfect adaptation, where the steady state input is independent of the steady state output. For potassium this would mean, that the same intracellular potassium concentration (output) is approached irrespective of the extracellular potassium concentration (input).

The activation of proton transport by Pma1 and the activation of the bicarbonate system counteracting low external potassium indicate the existence of a negative feedback loop. To further investigate this feedback, we have modified the potassium starvation experiment. As before, cells were grown at 50 mM external potassium, but now resuspended in media with different external potassium concentrations. The potassium efflux and the stationary internal concentrations are different for the different external concentrations, which is also reflected by the model (Figure 4A). To test whether these stationary intracellular concentrations are characteristic for the external potassium, we grew cells overnight in media with different external potassium concentrations (Figure 4B). When external potassium is plentiful (>1 mM), the internal concentration attains an upper limit of approx. 300 mM. For low external potassium (<1 mM), the internal concentration is proportional to the external and agrees with the stationary states of Figure 4A. These experiments show, that perfect adaptation by integral control is not a characteristic of potassium homeostasis for low external potassium. The molecular function and characteristics of this feedback have to be further explored.

Discussion

In summary, we found that direct regulation of potassium transport proteins is not sufficient for the maintenance of viable potassium levels inside the cell. Although the presence of Trk1,2 influences the dynamics of potassium loss under conditions of low potassium, the regulation of their activity is not the main regulatory process. Cells lacking these proteins have higher intracellular potassium concentrations and the loss of potassium after a rapid shift to low external potassium is slower than in wild type cells. The adaptation to low potassium requires a rapid modulation of proton fluxes as a rescue operation via the increased production of bicarbonate and the activation of the H⁺-ATPase Pma1 (Figure 5). The observation that the internal steady state potassium concentration is determined by the external concentration indicates, that potassium homeostasis is an example of non-perfect adaptation, excluding the existence of integral control. The detailed sensing and signaling mechanisms remain to be elucidated and currently we cannot distinguish whether changes in internal or external potassium are sensed directly or indirectly, e.g., as changes of the membrane potential.

Although we cannot completely rule out the possibility that other transport systems not considered in the model contribute to homeostasis, we have reason to believe that our model covers the

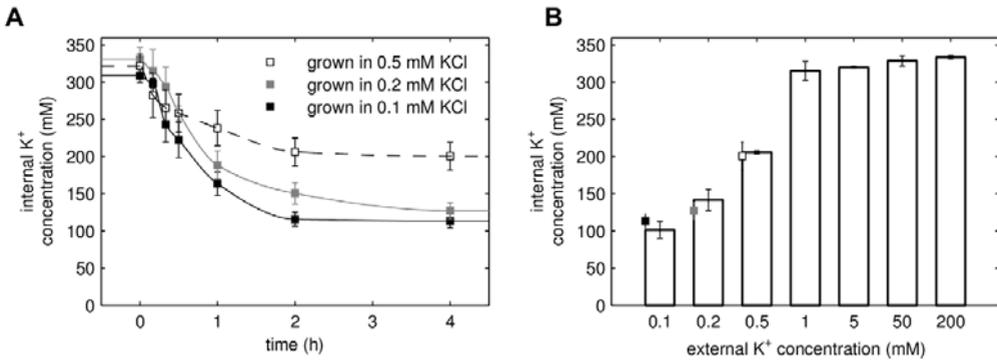


Figure 4. Relationship of external and internal potassium. (A) Cells grown in 50 mM KCl were resuspended in 0.1, 0.2 and 0.5 mM KCl and the time course of internal potassium was monitored. The lines show the data fit obtained from the reverse tracking algorithm. (B) Internal potassium concentration in cells grown overnight at different external potassium concentrations. The steady state concentrations from (A) are indicated as squares.

doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g004

dominant effects required for the maintenance of viable potassium levels under starvation conditions. All experiments were performed in the presence of calcium, which renders the activity of the calcium blocked non-selective cation pathway Nsc1 unlikely. In addition, non-specific transport of potassium is covered in the model by the leak current. The information about potassium storage in intracellular compartments in the literature is limited. To test the influence of intracellular potassium fluxes originating from an intracellular storage mechanism, we added a hypothetical compartment which can release potassium in response to starvation. This modification did not change the qualitative behavior of the model and was not sufficient to explain the slow efflux of potassium and the maintenance of sufficient intracellular potassium after starvation. Thus, we excluded this modification from the model.

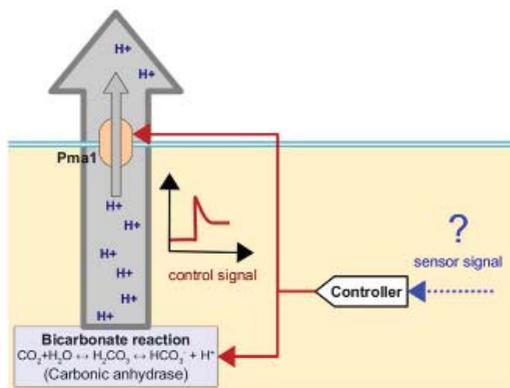


Figure 5. Proposed mechanism of potassium homeostasis. Changes of the external potassium concentration are sensed by an unidentified sensor system either directly or indirectly, e.g. via the membrane potential, internal potassium or pH changes. The sensor signal triggers a modulation of proton fluxes using the bicarbonate reaction system and the Pma1 proton pump as regulators.

doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g005

Many cation transporters are evolutionarily conserved in other yeast species and even in higher plants [1–3]. However, the current knowledge for these organisms is not as detailed. Considering the importance of ion homeostasis for some pathogenic yeasts [40] and for the growth and development of plants, the question of whether the regulation of proton fluxes plays a similar dominant role as in *S.c.* is an interesting starting point for future research.

The development of dynamic mathematical models requires a compilation of all parts and processes which could potentially be important for a cellular mechanism under consideration. Other processes believed to be negligible are often lumped together in the parameter values of the model. The decision of which processes to incorporate or to neglect is often hampered by insufficient biological knowledge. Incorporating too many details is impractical and leads to overly complex models with many parameters and little predictive power. On the other extreme are simplistic models which potentially neglect important processes and cannot reproduce the experimental data. We believe that our strategy to start with such a minimal model and to infer unmodeled dynamics with a reverse tracking approach might be of broader interest in systems biology. The reverse tracking algorithm provides (i) candidate points of applications for regulatory signals not explicitly captured by the model and (ii) an estimate of the corresponding time dependent regulatory signal. We emphasize that these potential regulatory signals have to be checked for biological plausibility and have to be validated by experiments. It can be applied when the core model for the process of interest is “underfitted”, i.e. when it can not sufficiently reproduce the experimental data because other regulatory process influence the parameters in the model. Its main advantage is that it can be applied even when an explicit modeling of the processes generating these regulatory inputs is beyond reach. On the other hand, the algorithm can be used as a tool for prioritizing experiments. In combination with experiments, it also may also help to indicate which model extensions are most promising.

Materials and Methods

Mathematical model

The basic structure of the mathematical model is given by Equations (1–5) in the Results section. Here we report the details

of the kinetic relationships. Parameter values, initial conditions and derivations are provided in the Text S1. In the following F , R and T denote the Faraday constant, the gas constant and the temperature.

Passive and secondary active potassium and proton transport. The concentration and voltage dependent transport currents of the passive or secondary active potassium and proton transporters (Equations (6–11) below) are described by the Ohmian relation $I = g(V_m - E)$, where the conductivity g is either constant (I_K^{leak} and I_H^{leak}) or a function of the membrane voltage (Trk1,2, Nha1, Tok1). The voltage dependent conductivity of the transporter $X \in \{\text{Trk1,2}, \text{Nha1}, \text{Tok1}\}$ was described by the function

$$g(V_m) = \frac{g_X}{1 + \exp\left(d \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_X^{1/2})\right)},$$

which can be derived from a simple model for the stochastic opening and closing of a transporter or channel [27,29,41]. The parameters d , $V_X^{1/2}$ and g_X for Tok1 were taken from the literature [42]; for Trk1,2 we estimated them from electrophysiological data [43]; see Figure S6 in Text S1. For Nha1 we assumed this voltage-dependent conductivity on the basis of [44]. This approach leads to the following transport kinetics (here $z = 1$)

$$I_K^{Trk1,2} = \frac{g_{Trk1,2} \times \mathcal{S}}{1 + e^{d_{Trk1,2} \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_{Trk1,2}^{1/2})}} \times (V_m - E_{Trk1,2}) \quad (6)$$

$$I_K^{Nha1} = - \frac{g_{Nha1} \times \mathcal{S}}{1 + e^{d_{Nha1} \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_{Nha1}^{1/2})}} \times (V_m - E_{Nha1}) \quad (7)$$

$$I_K^{Tok1} = \frac{g_{Tok1} \times \mathcal{S}}{1 + e^{d_{Tok1} \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_{Tok1}^{1/2})}} \times (V_m - E_{Tok1}) \quad (8)$$

$$I_K^{leak} = g_{K,leak} \times \mathcal{S} \times (V_m - E_{K,leak}) \quad (9)$$

$$I_H^{Nha1} = -2 \times I_K^{Nha1} \quad (10)$$

$$I_H^{leak} = g_{H,leak} \times \mathcal{S} \times (V_m - E_{H,leak}) \quad (11)$$

with the equilibrium potentials

$$E_{Trk1,2} = E_{K,leak} = E_{Tok1} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \quad (12)$$

$$E_{Nha1} = - \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} \times \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} \right) \quad (13)$$

$$E_{H,leak} = E_H = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} \quad (14)$$

The electric currents I are related to the mass fluxes J by

$$I = zF \frac{V}{A} J. \quad (15)$$

and the factor $\mathcal{S} = A(0)/A(t)$ was introduced to correctly incorporate the dependence of the conductance parameters on the surface area A of the cell.

The transport current for Pma1 depends on the free energy ΔG_{ATP} of ATP hydrolysis and was modeled as [45]

$$I_H^{Pma1} = I_{Pma1}^{max} \times \mathcal{S} \times \tanh \left(\frac{zF}{2RT} \left(V_m - \left(E_H + \frac{\Delta G_{ATP}}{F} \right) \right) \right), \quad (16)$$

Bicarbonate reaction. The model in [25] for the bicarbonate reaction sequence was supplemented by an effective metabolic carbon dioxide production or consumption flux $J_{CO_2}^{prod}$. The production rate $J_{CO_2}^{prod}$ is an input to the model. Note that the production changes with the volume even if the amount of produced CO_2 does not change. This is taken into account by the relationship

$$J_{CO_2}^{prod} = \tilde{J}_{CO_2}^{prod} \times \frac{V(0)}{V(t)}, \quad (17)$$

where $V(0)$ denotes the initial volume and $\tilde{J}_{CO_2}^{prod}$ is the volume independent rate, which is input to the model.

The dynamics of CO_2 in Equation (2) depends also on the transport fluxes for carbonic acid and bicarbonate

$$J_{H_2CO_3}^{transport} = \frac{P_{H_2CO_3}}{-\mathcal{R}} ([H_2CO_3]_o - [H_2CO_3]_i) \quad (18)$$

$$J_{HCO_3^-}^{transport} = \frac{P_{HCO_3^-}}{-\mathcal{R}} \frac{V_m F}{RT} \times \frac{[HCO_3^-]_o - [HCO_3^-]_i e^{-\frac{V_m F}{RT}}}{1 - e^{-\frac{V_m F}{RT}}}. \quad (19)$$

The parameters $P_{H_2CO_3}$ and $P_{HCO_3^-}$ are permeabilities for carbonic acid and bicarbonate respectively, and \mathcal{R} is the volume to surface ratio of the cell, see Text S1. The assumption behind Equation (18) is that the flux of carbonic acid is proportional to its concentration gradient. Equation (19) is a Goldman-Hodgkin-Katz flux equation for the electrodiffusive transport of ions across the membrane [25,41].

The fraction of total undissociated carbon dioxide

$$\alpha = \frac{[H^+]_i}{[H^+]_i + 10^{-pK_A}} \quad (20)$$

(pK_A of carbonic anhydrase) enters the rate of proton production in Equation (3), see Text S1 for a detailed derivation. The production fluxes of carbonic acid and bicarbonate

$$J_{H_2CO_3}^{prod} = \alpha \times J_{CO_2}^{prod}. \quad (21)$$

$$J_{HCO_3^-}^{prod} = (1 - \alpha) \times J_{CO_2}^{prod}. \quad (22)$$

depend on α and on the production rate of carbon dioxide $J_{CO_2}^{prod}$.

Cell volume. For the dynamics of the cell volume (Equation (5)) we used a model from the literature [28] which is based on the balance of internal and external osmotic pressure (Π_i and Π_o) and turgor pressure (Π_t):

$$\Pi_o = ([K^+]_o + [H^+]_o + [Cl^-]_o + [CO_2]_o + [X]_o) \times RT \quad (23)$$

$$\Pi_i = \frac{V}{V - f_V \times V(0)} \times ([K^+]_i + [H^+]_i + [CO_2]_i + [X]_i) \times RT \quad (24)$$

$$\Pi_t = \Pi_i(0) \times \frac{V - k_V \times V(0)}{V(0) - k_V \times V(0)} \quad (25)$$

$$\Pi_t(0) = \Pi_i(0) - \Pi_o(0). \quad (26)$$

Here, k_V is the fraction of the non-osmotic cell volume and f_V determines the elasticity of the cell wall. The internal and external concentration $[X]_{i,o}$ of other osmotically active substances are constant (see Text S1). A cell volume simulation for wildtype and *trk1,2* mutant can be found in Figure S5 in Text S1.

Potassium starvation. The external potassium concentration $[K^+]_o$ is an input to the model. The shift from a medium containing 50 mM KCl to the starvation medium was described by

$$[K^+]_o(t) = [Cl^-]_o(t) = \begin{cases} 0.05 \frac{\text{mmol}}{\text{cm}^3}, & \text{for } t < 0 \text{ sec.} \\ 15 \times 10^{-6} + (0.05 - 15 \times 10^{-6}) \times \exp\left(-\left(\frac{t}{\sigma}\right)^2\right) \frac{\text{mmol}}{\text{cm}^3}, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (27)$$

with $\sigma = 0.04 \times 60^2 \text{ sec}$.

Reverse tracking algorithm

Equations (1–5) have the form of a differential algebraic control system

$$\dot{x} = f(x(t), u(t), \theta), \quad g(x(t), u(t), \theta) = 0 \quad (28)$$

with $f, g: \mathbb{R}^n \times \mathbb{R} \times \mathbb{R}^p \rightarrow \mathbb{R}^n$. Here, x denotes the dynamical variables ($x = ([K^+]_i, p, H_i, [CO_2]_i, V)$) and Equation (4) for the membrane potential corresponds to the algebraic equation $g(x, u, \theta) = 0$. The scalar input function u is given by the external potassium concentration $u(t) = [K^+]_o(t)$. The solution of this system for given values of the parameters $\theta \in \mathbb{R}^p$ and a given input function $u(t)$ is denoted by $x(t, u(t), \theta)$. Assume now, that we can observe $m \leq n$ of the components x_i of x experimentally. We collect the experimentally observable components in $y \in \mathbb{R}^m$. This can be written as $y = Cx$ with a $m \times n$ matrix C with binary elements $c_{ij} \in \{0, 1\}$. For an experimentally observable variable $x_i = y_j$ the i -th column of C has a single entry $c_{ji} = 1$ and $\sum_j c_{ji} = 1$. A zero column with $\sum_j c_{jk} = 0$ indicates that x_k can not experimentally be observed and is thus excluded from y .

Assume further, that we have experimental data $y^{exp}(t_k)$ for certain time points t_k in response to the known input function $u(t)$. Most parameter estimation techniques aim to minimize the squared error

$$E(u, \theta) = \sum_k \|y^{exp}(t_k) - y(t_k)\|^2 \quad \text{with}$$

$$\|y^{exp}(t_k) - y(t_k)\|^2 = \sum_{j=1}^m (y_j^{exp}(t_k) - y_j(t_k))^2$$

over the parameter vector θ in order to bring the model prediction $y(t_k) = y(t_k, u(t), \theta)$ for a given input $u(t)$ close to the experimental data $y^{exp}(t_k)$. However, it might be the case that the minimum error $E(u(t), \theta^*) = \min_{\theta} E(u(t), \theta)$ is still too large so that the model cannot be regarded as a reasonable description of the data. This could mean that a dynamical process not explicitly accounted for renders at least one component θ_l of the parameter vector θ to be a time dependent function instead of being constant. The reverse tracking algorithm aims (i) to identify, which of the components θ_l of θ are *potentially* time dependent and (ii) to predict the time course $\theta_l(t)$ which minimizes the error. Although the unmodeled dynamical process might effect more than one component, we consider for simplicity each component θ_l separately and solve the problem

$$\min_{\theta_l(t)} E(u, \theta_l(t), \theta_l^*) \quad (29)$$

subject to the constraints

$$\dot{x} = f\left(x, u(t), \left(\theta_l(t), \theta_l^*\right)\right), \quad g\left(x, u(t), \left(\theta_l(t), \theta_l^*\right)\right) = 0, \quad y = Cx$$

for each component θ_l separately. Here, θ_l denotes the parameter vector θ with the l -th component excluded. We then regard $\theta_l(t)$ as a potential regulatory input, if the problem (29) has a solution with a minimum error smaller than a predefined threshold $\varepsilon > 0$: $\min_{\theta_l(t)} E(u, \theta_l(t), \theta_l^*) < \varepsilon$. There might be more than one potential regulatory input $\theta_l(t)$ and the decision of which of these are real can only be made from biological considerations or from additional validation experiments. For example, it might be that $\theta_l(t)$ has a huge magnitude or takes unrealistic values which could be used to exclude $\theta_l(t)$ from the list of potential regulatory inputs.

Mathematically, problem (29) is an optimal tracking problem, which often can be solved by a feedback control law [46]. This means that the function $\theta_l(t)$ is updated according to the local error $y(t) - y^{exp}(t)$ at time t . For a scalar y we found the integral controller [30]

$$\frac{d}{dt} \theta_l = \eta (y(t) - y^{exp}(t)) \quad (30)$$

to be a good solution. During a reverse tracking run, this equation is numerically integrated in parallel with the dynamic equations (28). Here, $y^{exp}(t)$ is a least squares spline fit to the experimental data points $y^{exp}(t_k)$. Details and suitable parameter values for η are provided in the Text S1.

Strains and medium

Details about the wildtype strain BY4741, the related *trk1,2* mutant and the Translucent K^+ free medium can be found in [12,21].

Potassium starvation experiments and concentration measurements

Cells were grown in Translucent K^+ -free medium supplemented with the indicated amount of KCl to an OD600 of 0.4–0.6.

Intracellular potassium concentrations were measured by atomic emission spectrometry after extracting the cells with acid as previously described [12]. The time course of internal potassium was obtained by growing the cells in 50 mM KCl, then cells were washed with Translucent K^+ -free medium (traces of KCl left: 15 μ M) and resuspended to the same K^+ free medium or containing the indicated KCl concentrations. Apart from the washing procedure the medium contains 2% glucose.

Gene expression measurements for *NCE103* coding for carbonic anhydrase

Data for *NCE103* expression changes upon potassium starvation was obtained in the context of a genome-wide transcriptomic analysis by DNA microarray (Barreto *et al.*, Manuscript submitted). Microarray data has been deposited at NCBF's Gene Expression Omnibus [47] and are accessible through GEO Series accession numbers GSE24711 (trk1 trk2 data) and GSE24712 (time-course data). Briefly, wild-type strain BY4741 cells were grown in Translucent medium supplemented with 50 mM KCl to OD 0.8. Cells were centrifuged and resuspended either in fresh Translucent medium with 50 mM KCl or without potassium. Samples (20 ml) were taken at 10, 20, 40, 60 and 120 min by rapid filtration from 4 biological replicates. Total RNA was extracted by using the Ribo Pure™ Yeast kit (Ambion) following the manufacturers instructions. cDNA was prepared and indirectly labeled with Cy3 and Cy5. Images with a resolution of 10 μ m were analyzed with the GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices).

Microarray data was confirmed by qRT-PCR using independent RNA samples. To this end, 60 ng of RNA were amplified using oligonucleotides RT_ *NCE103_5* (TCATTACCTGTCGCACTG) and RT_ *NCE103_3* (CACAAAAGTTACCCAAAA) and the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen).

Membrane isolation and determination of Pma1 activity

Cell cultures were grown at 28°C in Translucent YNB medium containing 50 mM KCl to OD660 0.6, then washed with Translucent K^+ -free medium and resuspended in the same medium without KCl. At the indicated times, cell samples were pelleted by centrifugation, resuspended in 100 μ l of fresh media (with KCl for $t=0$ and without KCl for the remaining samples), incubated for 5 minutes and frozen in liquid nitrogen. For the crude membrane purification, 100 μ l of 3 \times extraction buffer (0.3 M Tris-HCl pH 8.0, 180 mM KCl, 30 mM EDTA, 6 mM DTT and Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) was added to the thawed samples and cells were broken by vortexing in the presence of an equal volume of glass beads. 600 μ l of GTED20 buffer (20%

glycerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA and 1 mM DTT) were added to the crude extract, which was then centrifuged 5 minutes at 2000 rpm. The supernatant was transferred to a new tube and centrifuged 20 minutes at 13000 rpm. The insoluble fraction was resuspended and homogenized in 100 μ l of GTED20. The total amount of protein present was estimated using the Bradford assay (BioRad). The amount of Pma1 present in this protein fraction was estimated by comparing the amount of Pma1 to a protein standard curve separated in SDS-PAGE gels stained with Coomassie Blue. In a microtiter plate, 6 μ g of total protein (which corresponds to 0.3 μ g of Pma1) were assayed in the presence and absence of a Pma1-specific inhibitor, diethylstilbestrol (DES, final concentration 0.2 mM). The reaction was started by adding 65 μ l of the reaction buffer (50 mM MES-Tris pH 5.7, 5 mM MgSO₄, 50 mM KNO₃, 5 mM Na Azide, 0.3 mM Molybdate, 2 mM ATP) and the plate was incubated for 20 minutes at 30°C. The reaction was stopped by adding 130 μ l of detection solution (2% sulphuric acid, 0.5% ammonium molybdate, 0.5% SDS, 0.1% ascorbic acid) and the color was allowed to develop for 5 minutes before reading the absorbance in microplate reader (BioRad) at 750 nm. Residual activity values in the presence of DES were subtracted from the absolute activity values to obtain the Pma1 activity measurements. The results represent the average of at least 4 measurements at each time point and essentially identical results were observed in two separate experiments. Measurements of Pma1 activity are expressed in mmol/min/g Pma1. Error bars represent the standard deviation.

Supporting Information

Text S1 Supporting text containing additional information about the mathematical model.
(PDF)

Acknowledgments

The authors thank Hana Sychrova, Hella Lichtenberg, Joachim Ernst, Jost Ludwig, Wolfgang Alt and Milan Höfer for many useful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: M. Kahm, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschicho. Performed the experiments: C. Navarrete, V. Llopis-Torregrosa, R. Herrera, L. Barreto, J. Ramos. Analyzed the data: M. Kahm, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschicho. Contributed reagents/materials/analysis tools: M. Kahm, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschicho. Wrote the paper: M. Kahm, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschicho. Developed the mathematical model: M. Kahm, M. Kschicho.

References

- Blatt M, Slayman C (1987) Role of active potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by nonanimal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2737–2741.
- Rodríguez-Navarro A (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469: 1–30.
- Ariño J, Ramos J, Sychrova H (2010) Alkali-metal-cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 95–120.
- Merchan S, Pedelini L, Hueso G, Calzada A, Serrano R, et al. (2011) Genetic alterations leading to increases in internal potassium concentrations are detrimental for DNA integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 16: 152–165.
- Buch-Pedersen MJ, Rudashevskaya EL, Berner TS, Venema K, Palmgren MG (2006) Potassium as an intrinsic uncoupler of the plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 281: 38285–38292.
- Serrano R (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* 156: 11–14.
- Ko CH, Buckley AM, Gaber RF (1990) TRK2 is required for low affinity K^+ transport in *Saccha romyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305–312.
- Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176: 249–252.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A (1998) NSC1: A novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 432: 59–64.
- Roberts SK, Fischer M, Dixon GK, Sanders D (1999) Divalent cation block of inward currents and low-affinity K^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181: 291–297.
- Bañuelos M, Ruiz M, Jiménez A, Souciet JL, Potier S, et al. (2002) Role of the Nha1 antiporter in regulating K^+ influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19: 9–15.
- Navarrete C, Petrezschlyová S, Barreto L, Martínez J, Zahradka J, et al. (2010) Lack of main K^+ uptake systems in *S. cerevisiae* cells affects yeast cell physiological parameters both in potassium sufficient and limiting conditions. *FEBS Lett* 583: 508–517.
- Haro R, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291: 189–191.
- Márquez JA, Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* 382: 89–92.
- Ruiz A, Ariño J (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot Cell* 6: 2175–2183.

16. Bertl A, Slayman CL, 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.
17. Martínez-Muñoz GA, Peña A (2005) In situ study of K⁺ transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22: 689–704.
18. López R, Enriquez E, Peña A (1999) Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and ΔΨ in yeast. *Yeast* 15: 553–562.
19. Hess DC, Lu W, Rabinowitz JD, Botstein D (2006) Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLoS Biol* 4: 2012–2023.
20. Muzzey D, Gómez-Urbe CA, Mettetal JT, van Oudenaarden A (2009) A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell* 138: 160–171.
21. Petrešelyová S, Zahradka J, Sychrová H (2010) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* 114: 144–150.
22. Casado C, Yenush L, Melero C, del Carmen Ruiz M, Serrano R, et al. (2010) Regulation of Trk dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett* 584: 2415–2420.
23. Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR, et al. (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.
24. Yenush L, Merchan S, Holmes J, 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.
25. Boron W, de Weer P (1976) Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃ and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 67: 91–112.
26. Boron WF (2004) Regulation of intracellular pH. *Adv Physiol Educ* 28: 160–179.
27. Keener J, Sneyd J (2004) *Mathematical Physiology*. New York: Springer.
28. Gennemark P, Nordlander B, Hohmann S, Wedlin D (2006) A simple mathematical model of adaption to high osmolarity in yeast. *In Silico Biol* 6: 34.
29. Weiss TF (1996) *Cellular Biophysics - Transport*. Cambridge: Bradford.
30. Åström KJ, Murray RM (2009) *Feedback Systems*. Princeton and Oxford: Princeton University Press.
31. Yenush L, Mulet JM, Ariño J, 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.
32. Bihler H, Slayman CL, 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.
33. Serrano R (1978) Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 22: 51–63.
34. Portillo F, Serrano R (1988) Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. *EMBO J* 7: 1793–1798.
35. Vallejo CG, Serrano R (1989) Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* 5: 307–319.
36. Barreto L, Canadell D, Petrešelyová S, Navarrete C, Maresová L, et al. (2011) A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 10: 1241–1250.
37. Amoroso G, Morell-Avrahov L, Müller D, Klug K, Sültemeyer D (2005) The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol Microbiol* 56: 549–558.
38. Barkai N, Leibler S (1997) Robustness in simple biochemical networks. *Nature* 387: 913–917.
39. Yi TM, Huang Y, Simon MI, Doyle J (2000) Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4649–4653.
40. Miranda M, Bashi E, Vylkova S, Edgerton M, Slayman C, et al. (2009) Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 9: 278–292.
41. Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland: Sinauer.
42. Johansson I, Blatt M (2006) Interactive domains between pore loops of the yeast K⁺ channel Tok1 associate with extracellular K⁺ sensitivity. *Biochem J* 393: 645–655.
43. Kuroda T, Bihler H, Bashi E, Slayman C, Rivetta A (2004) Chloride channel function in the yeast Trk-potassium transporters. *J Membr Biol* 198: 177–192.
44. Ohgaki R, Nakamura N, Mitsui K, Kanazawa H (2005) Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺/H⁺ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1712: 185–196.
45. Endresen LP, Hall K, Høye JS, Myrheim J (2000) A theory for the membrane potential of living cells. *Eur Biophys J* 29: 90–103.
46. Xian B, Dawson DM, de Queiroz MS, Chen J (2003) A continuous asymptotic tracking control strategy for uncertain multi-input nonlinear systems. In: *Proceedings of Intelligent Control 2003 IEEE Int Symp*; 8 October 2003. pp. 52–57. doi:10.1109/ISIC.2003.1253913.
47. Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene expression omnibus: Nebi gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207–210.



Bibliografía

1. **Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R., and Halford, N.G. (1991).** Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8602–8605.
2. **Alvarez, C.E. (2008).** On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol. Biol.* 8, 222.
3. **Alvaro, C.G., O'Donnell, A.F., Prosser, D.C., Augustine, A.A., Goldman, A., Brodsky, J.L., Cyert, M.S., Wendland, B., and Thorner, J. (2014).** Specific β -Arrestins Negatively Regulate *Saccharomyces cerevisiae* Pheromone Response by Down-Modulating the G-Protein-Coupled Receptor Ste2. *Molecular and Cellular Biology* 34, 2660–2681.
4. **Anderson, R.G.W. (2003).** Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol.* 13, 534–539.
5. **Andoh, T., Hirata, Y., and Kikuchi, A. (2002).** PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. *FEBS Letters* 525, 131–134.
6. **Anemaet, I.G., and van Heusden, G.P. (2014).** Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to potassium starvation. *BMC Genomics* 15, 1040.
7. **Ariño, J., Ramos, J., and Sychrova, H. (2010).** Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, 95–120.

8. **Arnason, T., and Ellison, M.J. (1994).** Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 7876–7883.
9. **Arnason, T.G., Pisclevich, M.G., Dash, M.D., Davies, G.F., and Harkness, T.A.A. (2005).** Novel Interaction between Apc5p and Rsp5p in an Intracellular Signaling Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* *4*, 134–146.
10. **Baboshina, O.V., and Haas, A.L. (1996).** Novel Multiubiquitin Chain Linkages Catalyzed by the Conjugating Enzymes E2EPF and RAD6 Are Recognized by 26 S Proteasome Subunit 5. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 2823–2831.
11. **Baker, H.V. (1991).** GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *88*, 9443–9447.
12. **Bañuelos, M.A., Madrid, R., and Rodríguez-Navarro, A. (2000).** Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Molecular Microbiology* *37*, 671–679.
13. **Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.-L., and Potier, S. (1998).** The Nhal antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* *144*, 2749–2758.
14. **Barnett, J.A. (2008).** A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. *Yeast* *25*, 689–731.
15. **Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P., and Huibregtse, J.M. (1999).** Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 6972–6979.
16. **Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M.N. (1999).** Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *The Journal of Cell Biology* *146*, 1227–1238.
17. **Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., and Leon, S. (2012).** A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *The Journal of Cell Biology* *196*, 247–259.
18. **Belgareh-Touzé, N., Léon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M., Urban-Grimal, D., and Haguenaer-Tsapis, R. (2008).** Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking: Figure 1. *Biochemical Society Transactions* *36*,

791–796.

19. **Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martínez, P., and Ljungdahl, P.O. (2003).** Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.* *47*, 767–780.
20. **Bhalla, V., Daidié, D., Li, H., Pao, A.C., LaGrange, L.P., Wang, J., Vandewalle, A., Stockand, J.D., Staub, O., and Pearce, D. (2005).** Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 Regulates Ubiquitin Ligase Neural Precursor Cell-Expressed, Developmentally Down-Regulated Protein 4-2 by Inducing Interaction with 14-3-3. *Molecular Endocrinology* *19*, 3073–3084.
21. **Blondel, M.-O., Morvan, J., Dupré, S., Urban-Grimal, D., Haguenaer-Tsapis, R., and Volland, C. (2004).** Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 883–895.
22. **Boase, N.A., Rychkov, G.Y., Townley, S.L., Dinudom, A., Candi, E., Voss, A.K., Tsoutsman, T., Semsarian, C., Melino, G., Koentgen, F., et al. (2011).** Respiratory distress and perinatal lethality in *Nedd4-2*-deficient mice. *Nature Communications* *2*, 287.
23. **Bonifacino, J.S., and Weissman, A.M. (1998).** Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 19–57.
24. **Bork, P., and Sudol, M. (1994).** The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem. Sci.* *19*, 531–533.
25. **Broach, J.R. (2012).** Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics* *192*, 73–105.
26. **Carlson, M. (1998).** Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 560–564.
27. **Carmelo, V., Bogaerts, P., and Sá-Correia, I. (1996).** Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of *PMA1* and *PMA2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Arch. Microbiol.* *166*, 315–320.
28. **Casado, C., Yenush, L., Melero, C., Ruiz, M. del C., Serrano, R., Pérez-Valle, J., Ariño, J., and Ramos, J. (2010).** Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Letters* *584*, 2415–2420.
29. **Celenza, J.L., and Carlson, M. (1986).** A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* *233*, 1175–1180.

30. **Cheng, H.-C., Qi, R.Z., Paudel, H., and Zhu, H.-J. (2011).** Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. *Enzyme Research* 2011, 1–3.
31. **Christensen, T.S., Oliveira, A., and Nielsen, J. (2009).** Reconstruction and logical modeling of glucose repression signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology* 3, 7.
32. **Ciechanover, A., Hod, Y., and Hershko, A. (1978).** A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1100–1105.
33. **Cohen, P. (2002).** The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 4, E127–E130.
34. **Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003).** Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.
35. **Corton, J.M., Gillespie, J.G., and Hardie, D.G. (1994).** Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr. Biol.* 4, 315–324.
36. **Corzo-Leon, D.E., Alvarado-Matute, T., Colombo, A.L., Cornejo-Juarez, P., Cortes, J., Echevarria, J.I., Guzman-Blanco, M., Macias, A.E., Nucci, M., Ostrosky-Zeichner, L., et al. (2014).** Surveillance of *Candida* spp Bloodstream Infections: Epidemiological Trends and Risk Factors of Death in Two Mexican Tertiary Care Hospitals. *PLoS ONE* 9, e97325.
37. **Cox, K.H., Pinchak, A.B., and Cooper, T.G. (1999).** Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast* 15, 703–713.
38. **Cyert, M.S., and Philpott, C.C. (2013).** Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193, 677–713.
39. **David, Y., Cacheaux, L.P., Ivens, S., Lapilover, E., Heinemann, U., Kaufer, D., and Friedman, A. (2009).** Astrocytic Dysfunction in Epileptogenesis: Consequence of Altered Potassium and Glutamate Homeostasis? *Journal of Neuroscience* 29, 10588–10599.
40. **Diderich, J.A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttk, M.A.H., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Klaassen, P., Boelens, H.F.M., de Mattos, M.J.T., van Dam, K., et al. (1999).** Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15350–15359.
41. **Dunn, R., and Hicke, L. (2001).** Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 12, 421–435.

42. Dupré, S., Urban-Grimal, D., and Haguenaer-Tsapis, R. (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1695, 89–111.
43. Durell, S.R., and Guy, H.R. (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K(+) channel. *Biophys. J.* 77, 789–807.
44. Egner, R., and Kuchler, K. (1996). The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett.* 378, 177–181.
45. Eraso, P., Mazón, M.J., and Portillo, F. (2006). Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 164–170.
46. Erez, O., and Kahana, C. (2002). Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* trk1Delta trk2Delta mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 1142–1149.
47. Estrada, E., Agostinis, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Merlevede, W., Francois, J., Goffeau, A., and Ghislain, M. (1996). Phosphorylation of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase by Casein Kinase I. *Journal of Biological Chemistry* 271, 32064–32072.
48. Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., and Alkon, D.L. (1993). Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8209–8213.
49. Fernandes, A.R., and Sá-Correia, I. (2003). Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes and activity of plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* 20, 207–219.
50. Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The Ubiquitin-Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 319–360.
51. Fisk, H.A., and Yaffe, M.P. (1999). A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 145, 1199–1208.
52. Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.-C., and Wittenberg, C. (2003). Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. *Mol. Biol. Cell* 14, 3230–3241.
53. Forment, J., Mulet, J.M., Vicente, O., and Serrano, R. (2002). The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1, 2 potassium transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1565, 36–40.

54. **Fosset, M., Muir, L.W., Nielsen, L.D., and Fischer, E.H. (1971).** Purification and properties of yeast glycogen phosphorylase a and b. *Biochemistry* *10*, 4105–4113.
55. **Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988).** TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *8*, 2848–2859.
56. **Galan, J.-M., and Haguenaer-Tsapis, R. (1997).** Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *The EMBO Journal* *16*, 5847–5854.
57. **Gancedo, J.M. (1998).** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *62*, 334–361.
58. **Gao, T., Liu, Z., Wang, Y., Cheng, H., Yang, Q., Guo, A., Ren, J., and Xue, Y. (2013).** UUCD: a family-based database of ubiquitin and ubiquitin-like conjugation. *Nucleic Acids Research* *41*, D445–D451.
59. **García-Arranz, M., Maldonado, A.M., Mazón, M.J., and Portillo, F. (1994).** Transcriptional control of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation. *J. Biol. Chem.* *269*, 18076–18082.
60. **Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4241–4257.
61. **Gitan, R.S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M., and Eide, D. (1998).** Zinc-induced Inactivation of the Yeast ZRT1 Zinc Transporter Occurs through Endocytosis and Vacuolar Degradation. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 28617–28624.
62. **Goldstein, R.E. (1993).** A comparison of medium-chain and long-chain triglycerides in surgical patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* *17*, 481–482.
63. **Goodey, N.M., and Benkovic, S.J. (2008).** Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 474–482.
64. **Goossens, A., de la Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., and Portillo, F. (2000).** Regulation of Yeast H⁺-ATPase by Protein Kinases Belonging to a Family Dedicated to Activation of Plasma Membrane Transporters. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 7654–7661.
65. **Graschopf, A., Stadler, J.A., Hoellerer, M.K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S.D., and Schweyen, R.J. (2001).** The Yeast Plasma Membrane Protein Alr1 Controls Mg²⁺ Homeostasis and Is Subject to Mg²⁺-dependent Control of Its Synthesis and Degradation. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 16216–16222.

66. **Greatrix, B.W., and van Vuuren, H.J.J. (2006).** Expression of the HXT13, HXT15 and HXT17 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and stabilization of the HXT1 gene transcript by sugar-induced osmotic stress. *Curr. Genet.* *49*, 205–217.
67. **Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N.J., Parkinson, J., and Rotin, D. (2007).** Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Molecular Systems Biology* *3*.
68. **Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2013).** Structural determinants of arrestin functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* *118*, 57–92.
69. **Gwizdek, C., Hobeika, M., Kus, B., Ossareh-Nazari, B., Dargemont, C., and Rodriguez, M.S. (2005).** The mRNA Nuclear Export Factor Hpr1 Is Regulated by Rsp5-mediated Ubiquitylation. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 13401–13405.
70. **Hardie, D.G., Carling, D., and Carlson, M. (1998).** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 821–855.
71. **Harkness, T.A.A., Davies, G.F., Ramaswamy, V., and Arnason, T.G. (2002).** The ubiquitin-dependent targeting pathway in *Saccharomyces cerevisiae* plays a critical role in multiple chromatin assembly regulatory steps. *Genetics* *162*, 615–632.
72. **Hatakeyama, R., Kamiya, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2010).** Endocytosis of the Aspartic Acid/Glutamic Acid Transporter Dip5 Is Triggered by Substrate-Dependent Recruitment of the Rsp5 Ubiquitin Ligase via the Arrestin-Like Protein Aly2. *Molecular and Cellular Biology* *30*, 5598–5607.
73. **Hein, C., Springael, J.Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., and André, 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.
74. **Helliwell, S.B., Losko, S., and Kaiser, C.A. (2001).** Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *The Journal of Cell Biology* *153*, 649–662.
75. **Heredia, C.F., and Sols, A. (1964).** Metabolic studies with 2-Deoxyhexoses. II. Resistance to 2- Deoxyglucose in a yeast mutant. *Biochim. Biophys. Acta* *86*, 224–228.
76. **Herrador, A., Herranz, S., Lara, D., and Vincent, O. (2010).** Recruitment of the ESCRT Machinery to a Putative Seven-Transmembrane-Domain Receptor Is Mediated by an Arrestin-Related Protein. *Molecular and Cellular Biology* *30*, 897–907.
77. **Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998).** The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*

67, 425–479.

78. **Hershko, A., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (2000).** Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat. Med.* *6*, 1073–1081.
79. **Hettema, E.H., Valdez-Taubas, J., and Pelham, H.R. (2004).** Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *The EMBO Journal* *23*, 1279–1288.
80. **van Heusden, G.P.H. (2009).** 14-3-3 proteins: Insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* *94*, 287–293..
81. **van Heusden, G.P., Griffiths, D.J., Ford, J.C., Chin-A-Woeng, T.F., Schrader, P.A., Carr, A.M., and Steensma, H.Y. (1995).** The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur. J. Biochem.* *229*, 45–53.
82. **van Heusden, G.P., Wenzel, T.J., Lagendijk, E.L., de Steensma, H.Y., and van den Berg, J.A. (1992).** Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS Lett.* *302*, 145–150.
83. **Hicke, L. (1999).** Gettin'down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends in Cell Biology* *9*, 107–112.
84. **Hicke, L. (2001).** A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* *106*, 527–530.
85. **Hicke, L. (2001).** Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 195–201.
86. **Hicke, L., and Dunn, R. (2003).** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 141–172.
87. **Hicke, L., and Riezman, H. (1996).** Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* *84*, 277–287.
88. **Hicke, L., Schubert, H.L., and Hill, C.P. (2005).** Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 610–621.
89. **Hislop, J.N., and von Zastrow, M. (2011).** Role of Ubiquitination in Endocytic Trafficking of G-Protein-Coupled Receptors. *Traffic* *12*, 137–148.
90. **Hochstrasser, M. (2006).** Lingering Mysteries of Ubiquitin-Chain Assembly. *Cell* *124*, 27–34.
91. **Hofmann, K., and Bucher, P. (1995).** The rsp5-domain is shared by proteins of diverse

- functions. *FEBS Lett.* 358, 153–157.
92. **Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003).** Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8839–8843.
 93. **Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D., and Jentsch, S. (2000).** Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577–586.
 94. **Horák, J. (2003).** The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1614, 139–155.
 95. **Horák, J. (2013).** Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Current Genetics* 59, 1–31.
 96. **Horák, J., and Wolf, D.H. (1997).** Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* 179, 1541–1549.
 97. **Horák, J., and Wolf, D.H. (2001).** Glucose-Induced Monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* Galactose Transporter Is Sufficient To Signal Its Internalization. *Journal of Bacteriology* 183, 3083–3088.
 98. **Horák, J., Regelmann, J., and Wolf, D.H. (2002).** Two Distinct Proteolytic Systems Responsible for Glucose-induced Degradation of Fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p Transporter in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Share the Same Protein Components of the Glucose Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8248–8254.
 99. **Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995).** A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5249.
 100. **Ichimura, T., Yamamura, H., Sasamoto, K., Tominaga, Y., Taoka, M., Kakiuchi, K., Shinkawa, T., Takahashi, N., Shimada, S., and Isobe, T. (2005).** 14-3-3 Proteins Modulate the Expression of Epithelial Na⁺ Channels by Phosphorylation-dependent Interaction with Nedd4-2 Ubiquitin Ligase. *Journal of Biological Chemistry* 280, 13187–13194.
 101. **Iesmantavicius, V., Weinert, B.T., and Choudhary, C. (2014).** Convergence of ubiquitylation and phosphorylation signaling in rapamycin-treated yeast cells. *Mol. Cell Proteomics* 13, 1979–1992.

102. **Ikeda, F., and Dikic, I. (2008).** Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series. *EMBO Reports* *9*, 536–542.
103. **Jiang, R., and Carlson, M. (1996).** Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* *10*, 3105–3115.
104. **Jiang, H., Medintz, I., Zhang, B., and Michels, C.A. (2000).** Metabolic Signals Trigger Glucose-Induced Inactivation of Maltose Permease in *Saccharomyces*. *Journal of Bacteriology* *182*, 647–654.
105. **Johnson, L.N. (2009).** The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* *37*, 627–641.
106. **Johnston, M. (1999).** Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* *15*, 29–33.
107. **Johnston, M., and Kim, J.-H. (2005).** Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 247–252.
108. **Jolliffe, C.N., Harvey, K.F., Haines, B.P., Parasivam, G., and Kumar, S. (2000).** Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem. J.* *351 Pt 3*, 557–565.
109. **Jouandot, D., Roy, A., and Kim, J.-H. (2011).** Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (HXT) repressor Rgt1. *Journal of Cellular Biochemistry* *112*, 3268–3275.
110. **Kahm, M., Navarrete, C., Llopis-Torregrosa, V., Herrera, R., Barreto, L., Yenush, L., Ariño, J., Ramos, J., and Kschischo, M. (2012).** Potassium Starvation in Yeast: Mechanisms of Homeostasis Revealed by Mathematical Modeling. *PLoS Computational Biology* *8*, e1002548.
111. **Kamadurai, H.B., Souphron, J., Scott, D.C., Duda, D.M., Miller, D.J., Stringer, D., Piper, R.C., and Schulman, B.A. (2009).** Insights into Ubiquitin Transfer Cascades from a Structure of a UbcH5B~Ubiquitin-HECTNEDD4L Complex. *Molecular Cell* *36*, 1095–1102.
112. **Kamadurai, H.B., Qiu, Y., Deng, A., Harrison, J.S., MacDonald, C., Actis, M., Rodrigues, P., Miller, D.J., Souphron, J., Lewis, S.M., et al. (2013).** Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *eLife* *2*.
113. **Kang, D.S., Tian, X., and Benovic, J.L. (2014).** Role of β -arrestins and arrestin

- domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Current Opinion in Cell Biology* 27, 63–71.
114. **Kim, J.-H. (2006).** Two Glucose-sensing Pathways Converge on Rgt1 to Regulate Expression of Glucose Transporter Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 26144–26149.
115. **Kim, H.C., and Huibregtse, J.M. (2009).** Polyubiquitination by HECT E3s and the Determinants of Chain Type Specificity. *Molecular and Cellular Biology* 29, 3307–3318.
116. **Kim, H.C., Steffen, A.M., Oldham, M.L., Chen, J., and Huibregtse, J.M. (2011).** Structure and function of a HECT domain ubiquitin-binding site. *EMBO Reports* 12, 334–341.
117. **Kim, J.-H., Polish, J., and Johnston, M. (2003).** Specificity and Regulation of DNA Binding by the Yeast Glucose Transporter Gene Repressor Rgt1. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5208–5216.
118. **Kim, J.-H., Roy, A., Jouandot, D., and Cho, K.H. (2013).** The glucose signaling network in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 5204–5210.
119. **Kim, M.-S., Park, J.-Y., Namkoong, C., Jang, P.-G., Ryu, J.-W., Song, H.-S., Yun, J.-Y., Namgoong, I.-S., Ha, J., Park, I.-S., et al. (2004).** Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 10, 727–733.
120. **Ko, C.H., and Gaber, R.F. (1991).** TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4266–4273.
121. **Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. (1990).** TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125, 305–312.
122. **Kölling, R., and Hollenberg, C.P. (1994).** The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13, 3261–3271.
123. **Komander, D., and Rape, M. (2012).** The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.
124. **Krampe, S., and Boles, E. (2002).** Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett.* 513, 193–196.
125. **Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P., and Boles, E. (1998).** Catabolite

- inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* *441*, 343–347.
126. **Kravtsova-Ivantsiv, Y., Cohen, S., and Ciechanover, A. (2011).** Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF- κ B precursor. *Adv. Exp. Med. Biol.* *691*, 95–106.
127. **Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. (2006).** Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637–643.
128. **Kulathu, Y., and Komander, D. (2012).** Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 508–523.
129. **Kuo, M.H., and Grayhack, E. (1994).** A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 348–359.
130. **Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C.L., and Rivetta, A. (2004).** Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J. Membr. Biol.* *198*, 177–192.
131. **Lauwers, E., Jacob, C., and Andre, B. (2009).** K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *The Journal of Cell Biology* *185*, 493–502.
132. **Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (2010).** The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends in Cell Biology* *20*, 196–204.
133. **Lecchi, S., Nelson, C.J., Allen, K.E., Swaney, D.L., Thompson, K.L., Coon, J.J., Sussman, M.R., and Slayman, C.W. (2007).** Tandem Phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C-Terminus of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase Leads to Glucose-dependent Activation. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 35471–35481.
134. **Lefkowitz, R.J., Rajagopal, K., and Whalen, E.J. (2006).** New Roles for β -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. *Molecular Cell* *24*, 643–652.
135. **Léon, S., and Haguenaer-Tsapis, R. (2009).** Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Experimental Cell Research* *315*, 1574–1583.
136. **Léon, S., Erpapazoglou, Z., and Haguenaer-Tsapis, R. (2008).** Ear1p and Ssh4p

- are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* 19, 2379–2388.
137. **Li, W., and Ye, Y. (2008).** Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 2397–2406.
 138. **Li, J.Z., Absher, D.M., Tang, H., Southwick, A.M., Casto, A.M., Ramachandran, S., Cann, H.M., Barsh, G.S., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L., et al. (2008).** Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* 319, 1100–1104.
 139. **Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2008).** Arrestin-Related Ubiquitin-Ligase Adaptors Regulate Endocytosis and Protein Turnover at the Cell Surface. *Cell* 135, 714–725.
 140. **Liu, X.F. (1997).** Negative Control of Heavy Metal Uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 Gene. *Journal of Biological Chemistry* 272, 11763–11769.
 141. **Lobo, Z., and Maitra, P.K. (1977).** Resistance to 2-deoxyglucose in yeast: a direct selection of mutants lacking glucose-phosphorylating enzymes. *Mol. Gen. Genet.* 157, 297–300.
 142. **Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998).** Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953–961.
 143. **Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M., and Lu, K.P. (1999).** Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283, 1325–1328.
 144. **Lucero, P., and Lagunas, R. (1997).** Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 273–277.
 145. **Lucero, P., Penalver, E., Vela, L., and Lagunas, R. (2000).** Monoubiquitination Is Sufficient To Signal Internalization of the Maltose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 182, 241–243.
 146. **Ludin, K., Jiang, R., and Carlson, M. (1998).** Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6245–6250.
 147. **MacGurn, J.A., Hsu, P.-C., Smolka, M.B., and Emr, S.D. (2011).** TORC1 Regulates Endocytosis via Npr1-Mediated Phosphoinhibition of a Ubiquitin Ligase Adaptor. *Cell* 147, 1104–1117.

148. **MacGurn, J.A., Hsu, P.-C., and Emr, S.D. (2012).** Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 231–259.
149. **Madrid, R., Gómez, M.J., Ramos, J., and Rodríguez-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.
150. **Maier, A., Völker, B., Boles, E., and Fuhrmann, G.F. (2002).** Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res.* *2*, 539–550.
151. **Marchal, C., Haguener-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D. (1998).** A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 314–321.
152. **Marger, M.D., and Saier, M.H. (1993).** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* *18*, 13–20.
153. **Martínez, J.L., Sychrova, H., and Ramos, J. (2011).** Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet. Biol.* *48*, 177–184.
154. **Martinez, P., Zvyagilskaya, R., Allard, P., and Persson, B.L. (1998).** Physiological regulation of the derepressible phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *180*, 2253–2256.
155. **Mason, A.B., Kardos, T.B., and Monk, B.C. (1998).** Regulation and pH-dependent expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* *1372*, 261–271.
156. **Maspero, E., Valentini, E., Mari, S., Cecatiello, V., Soffientini, P., Pasqualato, S., and Polo, S. (2013).** Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 696–701.
157. **Matějčková-Forejto, A., Kinclová, O., and Sychrová, H. (1999).** Degradation of *Candida albicans* Can1 permease expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* *176*, 257–262.
158. **Mayordomo, I., Regelman, J., Horak, J., and Sanz, P. (2003).** *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 participate in the process of catabolite inactivation of maltose permease. *FEBS Letters* *544*, 160–164.
159. **McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2001).** Regulation of Snf1 Kinase: activation

- requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the *snf4* subunit. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36460–36466.
160. **McCusker, J.H., Perlin, D.S., and Haber, J.E. (1987).** Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4082–4088.
 161. **Medintz, I., Jiang, H., Han, E.K., Cui, W., and Michels, C.A. (1996).** Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 2245–2254.
 162. **Meena, R.C., Thakur, S., and Chakrabarti, A. (2011).** Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Plasma membrane H⁺-ATPase (Pma1) by Dextrose and Hsp30 during Exposure to Thermal Stress. *Indian Journal of Microbiology* 51, 153–158.
 163. **Merhi, A., and Andre, B. (2012).** Internal Amino Acids Promote Gap1 Permease Ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-Dependent Control of the Bul Arrestin-Like Adaptors. *Molecular and Cellular Biology* 32, 4510–4522.
 164. **Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012).** HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science* 125, 531–537.
 165. **Michel, B., Lozano, C., Rodríguez, M., Coria, R., Ramírez, J., and Peña, A. (2006).** The yeast potassium transporter TRK2 is able to substitute for TRK1 in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* 23, 581–589.
 166. **Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1994).** Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 2361–2364.
 167. **Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007).** Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 451–482.
 168. **Moriya, H., and 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.
 169. **Mosley, A.L. (2003).** Glucose-mediated Phosphorylation Converts the Transcription Factor Rgt1 from a Repressor to an Activator. *Journal of Biological Chemistry* 278, 10322–10327.
 170. **Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007).** Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201–205.
 171. **Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., and Serrano, R. (1999).**

- A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3328–3337.
172. **Nehlin, J.O., Carlberg, M., and Ronne, H. (1989).** Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene* *85*, 313–319.
173. **Nelissen, B., Mordant, P., Jonniaux, J.L., De Wachter, R., and Goffeau, A. (1995).** Phylogenetic classification of the major superfamily of membrane transport facilitators, as deduced from yeast genome sequencing. *FEBS Lett.* *377*, 232–236.
174. **Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005).** A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell* *123*, 773–786.
175. **Nikko, E., and Pelham, H.R.B. (2009).** Arrestin-Mediated Endocytosis of Yeast Plasma Membrane Transporters. *Traffic* *10*, 1856–1867.
176. **Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R.B. (2008).** Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Reports* *9*, 1216–1221.
177. **Nourani, A., Wesolowski-Louvel, M., Delaveau, T., Jacq, C., and Delahodde, A. (1997).** Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5453–5460.
178. **O'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G., and Cyert, M.S. (2010).** Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3552–3566.
179. **O'Donnell, A.F., Huang, L., Thorner, J., and Cyert, M.S. (2013).** A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6. *J. Biol. Chem.* *288*, 24063–24080.
180. **O'Donnell, A.F., McCartney, R.R., Chandrashekarappa, D.G., Zhang, B.B., Thorner, J., and Schmidt, M.C. (2015).** 2-Deoxyglucose Impairs *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Stimulating Snf1-Regulated and α -Arrestin-Mediated Trafficking of Hexose Transporters 1 and 3. *Molecular and Cellular Biology* *35*, 939–955.
181. **Oliveira, A.P., and Sauer, U. (2012).** The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Research* *12*, 104–117.
182. **Omura, F., and Kodama, Y. (2004).** The N-terminal domain of yeast Bap2 permease is phosphorylated dependently on the Npr1 kinase in response to starvation. *FEMS Microbiology Letters* *230*, 227–234.

183. **Omura, F., Kodama, Y., and Ashikari, T. (2001).** The basal turnover of yeast branched-chain amino acid permease Bap2p requires its C-terminal tail. *FEMS Microbiol. Lett.* *194*, 207–214.
184. **Ozcan, S., and Johnston, M. (1995).** Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1564–1572.
185. **Ozcan, S., Leong, T., and Johnston, M. (1996).** Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6419–6426.
186. **Ozcan, S., Dover, J., and Johnston, M. (1998).** Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *17*, 2566–2573.
187. **Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenuer-Tsapis, R., Casal, M., and Urban-Grimal, D. (2009).** Glucose-induced Ubiquitylation and Endocytosis of the Yeast Jen1 Transporter: role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 19228–19236.
188. **Pasula, S., Chakraborty, S., Choi, J.H., and Kim, J.-H. (2010).** Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast. *BMC Cell Biol.* *11*, 17.
189. **Patwari, P., and Lee, R.T. (2012).** An expanded family of arrestins regulate metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *23*, 216–222.
190. **Pereira, M.B.P., Tisi, R., Fietto, L.G., Cardoso, A.S., França, M.M., Carvalho, F.M., Trópia, M.J.M., Martegani, E., Castro, I.M., and Brandão, R.L. (2008).** Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *FEMS Yeast Research* *8*, 622–630.
191. **Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R., and Yenush, L. (2007).** Key Role for Intracellular K⁺ and Protein Kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the Plasma Membrane Stabilization of Yeast Nutrient Transporters. *Molecular and Cellular Biology* *27*, 5725–5736.
192. **Perez-Valle, J., Rothe, J., Primo, C., Martinez Pastor, M., Arino, J., Pascual-Ahuir, A., Mulet, J.M., Serrano, R., and Yenush, L. (2010).** Hal4 and Hal5 Protein Kinases Are Required for General Control of Carbon and Nitrogen Uptake and Metabolism. *Eukaryotic Cell* *9*, 1881–1890.
193. **Perlin, D.S., Brown, C.L., and Haber, J.E. (1988).** Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *263*, 18118–18122.

194. **Pizzirusso, M., and Chang, A. (2004).** Ubiquitin-mediated targeting of a mutant plasma membrane ATPase, Pma1-7, to the endosomal/vacuolar system in yeast. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2401–2409.
195. **Polish, J.A. (2005).** How the Rgt1 Transcription Factor of *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by Glucose. *Genetics* *169*, 583–594.
196. **Polo, S., and Di Fiore, P.P. (2008).** Finding the Right Partner: Science or ART? *Cell* *135*, 590–592.
197. **Portillo, F. (2000).** Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* *1469*, 31–42.
198. **Portillo, F., and Serrano, R. (1988).** Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. *EMBO J.* *7*, 1793–1798.
199. **Portillo, F., Eraso, P., and Serrano, R. (1991).** Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.* *287*, 71–74.
200. **Portillo, F., Mulet, J.M., and Serrano, R. (2005).** A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Letters* *579*, 512–516.
201. **Prista, C., Gonzalez-Hernandez, J.C., Ramos, J., and Loureiro-Dias, M.C. (2007).** Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* *153*, 3034–3043.
202. **Proft, M., and Struhl, K. (2004).** MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* *118*, 351–361.
203. **Ramos, J., Szkutnicka, K., and Cirillo, V.P. (1989).** Characteristics of galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles. *J. Bacteriol.* *171*, 3539–3544.
204. **Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T., and Noel, J.P. (1997).** Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* *89*, 875–886.
205. **Rao, R., Drummond-Barbosa, D., and Slayman, C.W. (1993).** Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H(+)-ATPase. *Yeast* *9*, 1075–1084.
206. **Reifenberger, E., Boles, E., and Ciriacy, M. (1997).** Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the

- triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* *245*, 324–333.
207. **Riballo, E., Herweijer, M., Wolf, D.H., and Lagunas, R. (1995).** Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* *177*, 5622–5627.
 208. **Richardson, A., Gardner, R.G., and Prelich, G. (2013).** Physical and Genetic Associations of the Irc20 Ubiquitin Ligase with Cdc48 and SUMO. *PLoS ONE* *8*, e76424.
 209. **Riezman, H. (1998).** Down regulation of yeast G protein-coupled receptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* *9*, 129–134.
 210. **Rintala, E., Wiebe, M.G., Tamminen, A., Ruohonen, L., and Penttilä, M. (2008).** Transcription of hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by change in oxygen provision. *BMC Microbiology* *8*, 53.
 211. **Risinger, A.L., and Kaiser, C.A. (2008).** Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2962–2972.
 212. **Rivetta, A., Allen, K.E., Slayman, C.W., and Slayman, C.L. (2013).** Coordination of K⁺ Transporters in *Neurospora*: TRK1 Is Scarce and Constitutive, while HAK1 Is Abundant and Highly Regulated. *Eukaryotic Cell* *12*, 684–696.
 213. **Rodríguez, M.S., Gwizdek, C., Haguenuer-Tsapis, R., and Dargemont, C. (2003).** The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* *4*, 566–575.
 214. **Rodríguez-Navarro, A., and Ramos, J. (1984).** Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *159*, 940–945.
 215. **Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J.M. (2002).** Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* *2*, 183–201.
 216. **Roth, A.F. (2000).** Ubiquitination of the PEST-like Endocytosis Signal of the Yeast a-Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 8143–8153.
 217. **Rotin, D., and Kumar, S. (2009).** Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 398–409.
 218. **Rotin, D., Staub, O., and Haguenuer-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.
 219. **Roy, A., Jouandot, D., Cho, K.H., and Kim, J.-H. (2014).** Understanding the mechanism of glucose-induced relief of Rgt1-mediated repression in yeast. *FEBS Open*

Bio 4, 105–111.

- 220. Sadler, J., Bryant, N., Gould, G., and Welburn, C. (2013).** Posttranslational Modifications of GLUT4 Affect Its Subcellular Localization and Translocation. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 9963–9978.
- 221. Sabatini, D.D. (2005).** In awe of subcellular complexity: 50 years of trespassing boundaries within the cell. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 1–33.
- 222. Santangelo, G.M. (2006).** Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 253–282.
- 223. Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A., and Carlson, M. (2000).** Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328.
- 224. Schlessner, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M., and Goffeau, A. (1988).** A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263, 19480–19487.
- 225. Schulman, B.A., and Wade Harper, J. (2009).** Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 319–331.
- 226. Séron, K., Blondel, M.O., Haguenaer-Tsapis, R., and Volland, C. (1999).** Uracil-induced down-regulation of the yeast uracil permease. *J. Bacteriol.* 181, 1793–1800.
- 227. Serrano, R. (1978).** Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 22, 51–63.
- 228. Serrano, R. (1983).** In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156, 11–14.
- 229. Serrano, R. (1988).** Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 1–28.
- 230. Serrano, R. (1993).** Structure, function and regulation of plasma membrane H(+)-ATPase. *FEBS Lett.* 325, 108–111.
- 231. Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., and Fink, G.R. (1986).** Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺/K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319, 689–693.
- 232. Seto-Young, D., and Perlin, D.S. (1991).** Effect of membrane voltage on the plasma membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 1383–1389.
- 233. Shabala, S., and Cuin, T.A. (2008).** Potassium transport and plant salt tolerance.

Physiol Plant 133, 651–669.

- 234. Shcherbik, N., Kumar, S., and Haines, D.S. (2002).** Substrate proteolysis is inhibited by dominant-negative Nedd4 and Rsp5 mutants harboring alterations in WW domain 1. *J. Cell. Sci.* 115, 1041–1048.
- 235. Shcherbik, N., Kee, Y., Lyon, N., Huißbregtse, J.M., and Haines, D.S. (2004).** A Single PXY Motif Located within the Carboxyl Terminus of Spt23p and Mga2p Mediates a Physical and Functional Interaction with Ubiquitin Ligase Rsp5p. *Journal of Biological Chemistry* 279, 53892–53898.
- 236. Shea, F.F., Rowell, J.L., Li, Y., Chang, T.-H., and Alvarez, C.E. (2012).** Mammalian Alpha Arrestins Link Activated Seven Transmembrane Receptors to Nedd4 Family E3 Ubiquitin Ligases and Interact with Beta Arrestins. *PLoS ONE* 7, e50557.
- 237. Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2001).** Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307–1313.
- 238. Shi, P.P., Cao, X.R., Sweezer, E.M., Kinney, T.S., Williams, N.R., Husted, R.F., Nair, R., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Sigmund, C.D., et al. (2008).** Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in mice deficient in the ubiquitin ligase Nedd4-2. *AJP: Renal Physiology* 295, F462–F470.
- 239. Shinoda, J., and Kikuchi, Y. (2007).** Rod1, an arrestin-related protein, is phosphorylated by Snf1-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 258–263.
- 240. Shore, D. (1997).** Telomere length regulation: getting the measure of chromosome ends. *Biol. Chem.* 378, 591–597.
- 241. Slayman, C.L., and Sanders, D. (1985).** Steady-state kinetic analysis of an electroenzyme. *Biochem. Soc. Symp.* 50, 11–29.
- 242. Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010).** Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 56, 1–32.
- 243. Smith, T.L., and Rutter, J. (2007).** Regulation of Glucose Partitioning by PAS Kinase and Ugp1 Phosphorylation. *Molecular Cell* 26, 491–499.
- 244. Smith, F.C., Davies, S.P., Wilson, W.A., Carling, D., and Hardie, D.G. (1999).** The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Lett.* 453, 219–223.

245. **Snyder, P.M. (2003).** Relative Contribution of Nedd4 and Nedd4-2 to ENaC Regulation in Epithelia Determined by RNA Interference. *Journal of Biological Chemistry* 279, 5042–5046.
246. **Soares, L.M., and Buratowski, S. (2012).** Yeast Swd2 Is Essential Because of Antagonism between Set1 Histone Methyltransferase Complex and APT (Associated with Pta1) Termination Factor. *Journal of Biological Chemistry* 287, 15219–15231.
247. **Soetens, O., De Craene, J.-O., and Andre, B. (2001).** Ubiquitin Is Required for Sorting to the Vacuole of the Yeast General Amino Acid Permease, Gap1. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43949–43957.
248. **Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995).** A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1265–1273.
249. **Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D. (2000).** Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67–76.
250. **Spielewoy, N., Flick, K., Kalashnikova, T.I., Walker, J.R., and Wittenberg, C. (2004).** Regulation and Recognition of SCFGrr1 Targets in the Glucose and Amino Acid Signaling Pathways. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8994–9005.
251. **Springael, J.Y., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (1999).** NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 9), 1375–1383.
252. **Stanbrough, M., and Magasanik, B. (1995).** Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 94–102.
253. **Stark, C., Su, T.-C., Breikreutz, A., Lourenco, P., Dahabieh, M., Breikreutz, B.-J., Tyers, M., and Sadowski, I. (2010).** PhosphoGRID: a database of experimentally verified in vivo protein phosphorylation sites from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Database* 2010, bap026–bap026.
254. **Stawiecka-Mirota, M., Pokrzywa, W., Morvan, J., Zoladek, T., Haguenaer-Tsapis, R., Urban-Grimal, D., and Morsomme, P. (2007).** Targeting of Sna3p to the Endosomal Pathway Depends on Its Interaction with Rsp5p and Multivesicular Body Sorting on Its Ubiquitylation. *Traffic* 8, 1280–1296.
255. **Stimpson, H.E.M., Lewis, M.J., and Pelham, H.R.B. (2006).** Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J.* 25, 662–672.
256. **Strickfaden, S.C., Winters, M.J., Ben-Ari, G., Lamson, R.E., Tyers, M., and Pryciak,**

- P.M. (2007).** A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell* 128, 519–531.
- 257. Struhl, K. (1985).** Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 8419–8423.
- 258. Sullivan, J.A., Lewis, M.J., Nikko, E., and Pelham, H.R.B. (2007).** Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase *rsp5* to membrane proteins in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 18, 2429–2440.
- 259. Sun, L., and Chen, Z.J. (2004).** The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 119–126.
- 260. Sung, MK., and Huh, WK. (2007).** Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24, 767–775.
- 261. Supply, P., Wach, A., and Goffeau, A. (1993).** Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 19753–19759
- 262. Szkutnicka, K., Tschopp, J.F., Andrews, L., and Cirillo, V.P. (1989).** Sequence and structure of the yeast galactose transporter. *J. Bacteriol.* 171, 4486–4493.
- 263. Tafelmeyer, P., Johnsson, N., and Johnsson, K. (2004).** Transforming a (beta/alpha)₈-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chem. Biol.* 11, 681–689.
- 264. Tardiff, D.F., Jui, N.T., Khurana, V., Tambe, M.A., Thompson, M.L., Chung, C.Y., Kamadurai, H.B., Kim, H.T., Lancaster, A.K., Caldwell, K.A., et al. (2013).** Yeast reveal a “druggable” Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. *Science* 342, 979–983.
- 265. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000).** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94–102.
- 266. Tian, X., Kang, D.S., and Benovic, J.L. (2014).** β -Arrestins and G Protein-Coupled Receptor Trafficking. In *Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential*, V.V. Gurevich, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 173–186.
- 267. Tian, X., Kang, D.S., and Benovic, J.L. (2014).** β -arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Handb Exp Pharmacol* 219, 173–186.
- 268. Tomás-Cobos, L., Viana, R., and Sanz, P. (2005).** TOR kinase pathway and 14-3-

- 3 proteins regulate glucose-induced expression of HXT1, a yeast low-affinity glucose transporter. *Yeast* 22, 471–479.
269. **Tomás-Cobos, L., and Sanz, P. (2002).** Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HXT1 glucose transporter gene. *Biochem. J.* 368, 657–663.
270. **Tomás-Cobos, L., Casadomé, L., Mas, G., Sanz, P., and Posas, F. (2004).** Expression of the *HXT1* Low Affinity Glucose Transporter Requires the Coordinated Activities of the HOG and Glucose Signalling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 279, 22010–22019.
271. **Treitel, M.A., and Carlson, M. (1995).** Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3132–3136.
272. **Tu, J., and Carlson, M. (1995).** REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 5939–5946.
273. **Uemura, H., and Jigami, Y. (1992).** GCR3 encodes an acidic protein that is required for expression of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174, 5526–5532.
274. **Verdecia, M.A., Joazeiro, C.A.P., Wells, N.J., Ferrer, J.-L., Bowman, M.E., Hunter, T., and Noel, J.P. (2003).** Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol. Cell* 11, 249–259.
275. **Vidal, M., Buckley, A.M., Yohn, C., Hoepfner, D.J., and Gaber, R.F. (1995).** Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of TRK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2370–2374.
276. **Viegas, C.A., Sebastiao, P.B., Nunes, A.G., and Sá-Correia, I. (1995).** Activation of plasma membrane H (+)-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1904–1909.
277. **Viegas, C.A., Supply, P., Capieaux, E., Van Dyck, L., Goffeau, A., and Sá-Correia, I. (1994).** Regulation of the expression of the H(+)-ATPase genes PMA1 and PMA2 during growth and effects of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1217, 74–80.
278. **De Vit, M.J., Waddle, J., and Johnston, M. (1997).** Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1603–1618.
279. **Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., and Banerjee, R. (2012).** Na⁺

- and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822, 1671–1681.
280. **Volland, C., Urban-Grimal, D., Géraud, G., and Haguenaer-Tsapis, R. (1994).** Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* 269, 9833–9841.
281. **Wendell, D.L., and Bisson, L.F. (1994).** Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.* 176, 3730–3737.
282. **Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek, P.J., and van Dijken, J.P. (1994).** Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.* 58, 616–630.
283. **Winget, J.M., and Mayor, T. (2010).** The Diversity of Ubiquitin Recognition: Hot Spots and Varied Specificity. *Molecular Cell* 38, 627–635.
284. **Wolf, W., Meese, K., and Seedorf, M. (2014).** Ist2 in the Yeast Cortical Endoplasmic Reticulum Promotes Trafficking of the Amino Acid Transporter Bap2 to the Plasma Membrane. *PLoS ONE* 9, e85418.
285. **Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T.E., et al. (2013).** AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell* 49, 1167–1175.
286. **Yachie, N., Saito, R., Sugiyama, N., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2011).** Integrative Features of the Yeast Phosphoproteome and Protein–Protein Interaction Map. *PLoS Computational Biology* 7, e1001064.
287. **Yang, B., and Kumar, S. (2010).** Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ.* 17, 68–77.
288. **Ye, L., Kruckeberg, A.L., Berden, J.A., and van Dam, K. (1999).** Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J. Bacteriol.* 181, 4673–4675.
289. **Yenush, L., Mulet, J.M., Ariño, J., and Serrano, R. (2002).** The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* 21, 920–929.
290. **Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., and Serrano, R. (2005).** pH-Responsive, Posttranslational Regulation of the Trk1 Potassium Transporter by the Type 1-Related Ppz1 Phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* 25, 8683–8692.

291. **Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., and Sychrová, H. (2012).** Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 849–858.
292. **Zaman, S., Lippman, S.I., Schneper, L., Slonim, N., and Broach, J.R. (2009).** Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Molecular Systems Biology* 5.
293. **Zhao, Y., Macgurn, J.A., Liu, M., and Emr, S. (2013).** The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *Elife* 2, e00459.
294. **Ziv, I., Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Erpapazoglou, Z., Leon, S., Pantazopoulou, M., Kim, W., Gygi, S.P., Haguenuer-Tsapis, R., Reis, N., et al. (2011).** A Perturbed Ubiquitin Landscape Distinguishes Between Ubiquitin in Trafficking and in Proteolysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 10, M111.009753–M111.009753.
295. **Zoladek, T., Tobiasz, A., Vaduva, G., Boguta, M., Martin, N.C., and Hopper, A.K. (1997).** MDP1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial/cytoplasmic protein distribution, is identical to the ubiquitin-protein ligase gene RSP5. *Genetics* 145, 595–603.



Agradecimientos

Y llegados a este punto, solo queda dar las gracias a toda la gente que ha estado a mi lado a lo largo de todos los años que me ha costado llegar a escribir esto. Porque ahora que miro hacia atrás, todo parece aún mejor de lo que fue.

A Leda y a Guillem por hacer que el principio fuera el mejor de los principios posibles. Por ayudarme a confirmar que a trabajar se puede ir con alegría, por hacerme ver lo que era en verdad la ciencia, por las cenas, por la música...

A Ceci, por ser ejemplo de compañerismo, por haber dejado de sonreír solo tres días de los tres años largos que pasamos juntos. Porque a veces una mirada bastaba. Por las confesiones entre placas y los momentos en los que revelábamos juntos y compartíamos las historias que habían detrás de nuestras bandas.

A Mari Carmen, por cuidarnos tanto, por dejar de lado cualquier cosa con tal de echarnos una mano, porque sé que eres una chica fuerte y eres capaz de hacer todo lo que haces y mucho más. Por dejar que te cantáramos la canción una y otra vez dejándote arrancar siempre una sonrisa.

A Anita, por todo lo que nos hemos reído, poniendo en peligro nuestras vidas al entrar en un bucle de risa contagiosa de -o paro o me ahogo-, porque contigo me dejaba llevar sin manías, porque esta etapa la vivimos juntos de principio a fin, por compartir tanto preocupaciones como alegrías y amores.

Als meus estudiants. A Sara, per ser tan bonica sense saber-ho, per eixa mirada que transmet calma, perquè des del primer dia vaig entendre que ens duríem bé. A Alba, perquè compartim una lluita, per eixe puntàs de rebel·lia, per saber trobar la motivació quan era difícil. A Pablo, per les animalaies que em feien sentir com a casa, per els ratos de cigarret a l'escala, per l'entusiasme.

Y por supuesto a Lynne, por hacer que todo lo anterior sea posible, por confiar tanto en nosotros y haber tenido tanta paciencia conmigo. Por tener siempre planes B, C y D, por haberme enseñado tantas cosas y haberme forjado como científico. Porque nunca olvidaré tu correo donde decías que habías decidido apostar por mí. Porque si volviese a empezar una tesis, sin duda, la volvería a empezar contigo.

A Raquel, per els dinars i els cigarrets de tots els dies, per les visites al labo, perquè en veritat eixos eren els moments que feien el dia redó. Per ser tan bona gent. A Regi, per els dinars, els sopars, el concerts i els gintònics que ja fa temps que no ens fem. Perquè amb tu, el café de les cinc era una de les cites diaries més esperades. Per les històries de tots els dies i les que vindran. A Alfredo, por alegrarnos la existencia a todos los que estuvimos cerca de ti, por los cuentos, por el desparpajo, porque si es contigo no hace falta nadie más. Porque sé que me quedo con un amigo. A Ricardo, per donar-me tant de bon rotillo i tranquil·litat. Perquè amb tu tot era fàcil. Perquè encara que ens vejам poc, sempre m'alegraré.

A Sandra, per donar-li color als passetjos pel corredor. Per tindre sempre un somriure a punt per a mi. A Rafa por los cafés matutinos tan variables en el tiempo pero con el doblete asegurado. Un placer sentarme al sol contigo. A Myriam por los ratos de terraza y por haberme escuchado cuando lo necesité. A Félix por traer aún más alegría al laboratorio. Porque cuando te oíamos reír a través de la pared reíamos nosotros también. A Miguel y Lesia por los ratos de balcón y las conversaciones de pasillo. A Jose per tindre sempre deu minuts per a xarrar. A Marisol por hacer que subir a ver levaduras en el microscopio fuera un placer.

A Dolores, por haberle puesto la guinda a la tesis. Porque contigo es posible reír hasta cuando se hacen las correcciones después de una revisión. Por las cervezas, barbacoas y cenas. Así es fácil sentir que tenemos una familia científica. Por todo lo que aún nos queda.

A Paul Van Heusden por haberme hecho sentir bienvenido en su laboratorio.

A Rubén, per haver sigut el company de pis perfecte. Perquè varem descobrir un món nou junts. Perquè sé que sempre estaràs a prop. Perquè sempre que pense en tu et veig somriure.

A Arantza, perquè malgrat estar lluny tenim records bonics que ens mantenen units. Perquè em compartit èpoques clau a les nostres vides, i això ha fet que sempre tinga un poc de tu sempre amb mi.

A Luis, por ser capaz de sacarme de quicio así como de arrancarme la parte más existencial. Por las largas charlas que al final era mejor cortar, previniendo de esa manera la locura.

A Elena, per ser la novia que mai tindré. Perquè parlar amb tu sempre inclou alegría. Perquè fer-te riure es molt fàcil. Per ser companya de nit. Confident.

A Desa, Laura, Andrea, Jessica, Ana, Teresa, María, Monxo, Lluís...Per tot el que hem passat junts. Perquè lo millor encara està per vindre.

A Paolo. Por haber vivido gran parte de esta historia. Por seguir estando presente en ella. Te deseo lo mejor.

A Martin, Meri, Salva, Stefano, Paula, Marta...Per fer que les coses foren molt més fàcils a Praga. Espere no perdre-vos el rastre mai.

A la meua família, ties i tios, cosines i cosins. Per haver-me ajudat a ser qui sóc. Perquè segur que en mi hi ha una part de tots vosaltres.

A ma uela. Al món li desitge més dones com tu.

Als meus pares, per haver-me fet creixer en llibertat i haver-me donat suport en cada decisió. Per no haver posat en dubte mai res. Per ser exemple d'esforç i de tantes altres coses.

Al meu germà, el millor de tots els germans possibles. Per haver mostrat sempre tant de respecte i tanta estima. A Hindu, per transmetre confiança.

A tota la gent de la que m'oblidi i que ha deixat alguna cosa al seu pas per la meua vida.

Amb tot açò es tanca una etapa.

Esta tesi doctoral va ser escrita a Praga entre desembre de 2013 i desembre de 2015.

